

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS
EVALUACIÓN PROBIÓTICA Y FUNCIONAL DE BACTERIAS DE LA FAMILIA
LACTOBACILLACEAE AISLADAS DEL PULQUE**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

M. en C. YESICA RUIZ RAMÍREZ

2192802076

ruiz9117@gmail.com/ruiz1706@xanum.uam.mx

ORCID: 0000-0001-6288-4436

**DIRECTORA: DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA
CODIRECTOR: DR. ROGELIO VALADEZ BLANCO**

JURADO

PRESIDENTE: DRA. MARÍA DE LOURDES PÉREZ CHABELA

SECRETARIO: DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

VOCAL: DR. ALEJANDRO AZAOLA ESPINOSA

VOCAL: DR. ISRAEL GARCÍA CANO

IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO A 18 DE ENERO, 2024

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP) del CONAHCYT, con la referencia 001466.

Agradecemos al CONAHCYT por la beca de doctorado otorgada No. 754129.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de Macromoléculas del Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Edith Ponce Alquicira. Parte del trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, bajo la dirección del Dr. Rogelio Valadez Blanco

Ciudad de México a 18 de enero, 2024

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**EVALUACIÓN PROBIÓTICA Y FUNCIONAL DE BACTERIAS DE LA FAMILIA
LACTOBACILLACEAE AISLADAS DEL PULQUE**

que presentó

M. en C. YESICA RUIZ RAMIREZ

Comité Tutorial:

Director: Dra. Edith Ponce Alquicira

Codirector: Dr. Rogelio Valadez Blanco

Asesora: Dra. María De Lourdes Pérez Chabela

Jurado:

Presidente: Dra. María De Lourdes Pérez Chabela
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Iztapalapa

Secretario: Dr. Ulises Carrasco Navarro
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Iztapalapa

Vocal: Dr. Alejandro Azaola Espinosa
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Xochimilco

Vocal: Dr. Israel García Cano
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

DEDICATORIA

A mis padres:

**Rubén Hugo Ruiz Luis
Crispina Ramírez Zarate**

Por su amor, apoyo y respaldo siempre.
Por todo el tiempo que me he ausentado
y he tenido su comprensión.
¡Los amo mucho!

A mi abuelo:

Hipólito Ramírez Robles

Aunque hoy no lo recuerdes, me
regalaste grandes historias y
recuerdos que siempre me
acompañan.
¡Ya no solo somos ingenieros!

A mis abuelos:

**Hipólito Ruiz Cortez †
Esperanza Luis García†
Leónides Zavaleta Zarate †**

A los que perdí físicamente,
pero que siempre me acompañan
en el corazón.

A mí

Porque estar lejos de casa siempre es difícil,
a pesar de que sea buscando tus sueños.
Por mi fortaleza, pasión y dedicación.

Te perdí a poco tiempo de concluir este proyecto y sé que
estabas profundamente orgulloso de mí, lo dijiste
incansablemente. Seguramente no fuiste perfecto, pero nos
amaste a tu manera. Con todo mi cariño:

Enerio Ramírez Zavaleta †

¡A mi luz en el cielo!

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Edith Ponce Alquicira, por dirigir esta tesis y acompañarme en el proceso. Muchas gracias, porque sin conocerme me abrió las puertas del laboratorio y me permitió trabajar en este proyecto. Es una excelente investigadora, pero sobre todo es un gran ser humano.

Al Dr. Rogelio Valadez Blanco, por permitirme seguir contando con su apoyo y conocimiento. Por las facilidades, que junto a la Dra. Paula C. Guadarrama me brindaron para trabajar en el Laboratorio de Bioprocesos. Gracias a ambos por todo lo compartido.

A mi asesora la Dra. María de Lourdes Pérez Chabela por su apoyo, revisión y honestidad. A los revisores de esta tesis, Dr. Ulises Carrasco Navarro, Dr. Alejandro Azaola Espinosa y Dr. Israel García Cano, por el tiempo dedicado a la revisión de este documento y por los conocimientos que amable y humildemente me compartieron.

A la M. en C. Concepción Calderón García por su valiosa aportación al trabajo y por brindarme su compañía en el proceso. A la Biol. Mónica Rincón Guevara por su apoyo en la identificación de las cepas por espectrometría de masas en el Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. A las Ingenieras Rocío Nayeli Aquino Hernández y Celia Anahí Flores Valencia, por su apoyo y disponibilidad, serán excelentes en todo lo que decidan hacer.

A mi familia, en especial a mis padres, hermana Adriana y sobrinos (Ixchel y Pablo), por ser mi motivación, compañía y fortaleza siempre. ¡Los amo mucho!

A mis compañeros del Laboratorio W-207 y Bioprocesos: Angela, Rubí, Jessica, Arquimides, Juquilita, Monserrat y Frida, por todo lo compartido.

Siempre estaré agradecida con la vida por cruzarme con un ser maravilloso, inteligente y amoroso que me acompaña y me cuida. Gracias por regalarme parte de ti, de tu tiempo y de tu historia.

A los ciudadanos mexicanos que por medio del CONAHCYT me permitieron contar con el apoyo de manutención de doctorado.

Son muchas las personas a las que me gustaría agradecer su apoyo, consejos y amistad. Sin importar donde estén, ¡GRACIAS!

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
RESUMEN	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. INTRODUCCIÓN.....	18
2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	21
2.1. Bacterias ácido lácticas (BAL)	21
2.1.1. Clasificación taxonómica	21
2.1.1.1. Familia Lactobacillaceae	22
2.1.2. Hábitat y aplicaciones de las BAL.....	24
2.1.2.1. Bacterias ácido lácticas en la fermentación de alimentos	24
2.1.2.2. Bacterias ácido lácticas empleadas como bioconservadores.....	27
2.1.2.3. Bacterias ácido lácticas probióticas	32
2.2. Probióticos.....	32
2.2.1. Criterios de evaluación para seleccionar microorganismos como probióticos .	33
2.2.1.1. Tolerancia al estrés gastrointestinal.....	37
2.2.1.2. Capacidad de adhesión	38
2.2.1.3. Actividad antimicrobiana.....	39
2.2.1.4. Evaluación de seguridad	40
2.2.1.5. Propiedades funcionales	41
2.2.1.6. Requerimientos industriales.....	44
2.2.1.7. Caracterización ómica	44
2.2.2. Probióticos comerciales.....	44
2.3. Pulque	46
2.3.1. Microbiología del pulque.....	48

2.3.2.	Beneficios del pulque.....	49
2.3.3.	Bacterias del pulque con potencial probiótico	51
3.	JUSTIFICACIÓN	57
4.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	59
4.1.	Hipótesis.....	59
4.2.	Objetivo general	59
4.3.	Objetivos particulares	59
5.	DIAGRAMA EXPERIMENTAL	60
6.	METODOLOGÍA.....	61
6.1.	Material biológico y condiciones de cultivo	61
6.2.	Identificación de las bacterias ácido lácticas del pulque	61
6.2.1.	Identificación por el gen 16S ARNr	61
6.2.2.	Identificación de aislados bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI Biotyper®.....	63
6.3.	Resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas	64
6.3.1.	Resistencia a lisozima	65
6.3.2.	Resistencia a jugo gástrico (JG) y jugo intestinal (JI).....	65
6.3.3.	Actividad de la enzima hidrolasa de sales biliares (HSB).....	65
6.3.4.	Evaluación de actividad antagónica [168]	66
6.3.5.	Actividad antibacteriana.....	66
6.4.	Propiedades de superficie celular	67
6.4.1.	Hidrofobicidad.....	67
6.4.2.	Autoagregación	68
6.4.3.	Coagregación	68
6.5.	Aspectos de seguridad de las BAL	68
6.5.1.	Resistencia a antibióticos	69
6.5.1.1.	Método de difusión en agar	69
6.5.1.2.	Ensayo por PCR.....	69
6.5.2.	Detección de factores de virulencia	71
6.5.3.	Actividad hemolítica.....	71

6.6.	Caracterización funcional.....	72
6.6.1.	Actividad antioxidante.....	72
6.6.2.	Actividad β -galactosidasa	72
6.6.3.	Reducción del colesterol.....	73
6.7.	Análisis estadístico y multivariable.....	73
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
7.1.	Identificación de BAL.....	75
7.2.	Resistencia a condiciones gastrointestinales.....	77
7.2.1.	Condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.....	77
7.2.2.	Actividad hidrolasa de sales biliares	80
7.2.3.	Actividad antagónica.....	82
7.2.4.	Actividad antibacteriana.....	83
7.3.	Propiedades de la superficie celular	83
7.3.1.	Hidrofobicidad.....	83
7.3.2.	Autoagregación	84
7.3.3.	Coagregación	85
7.4.	Evaluación de seguridad.....	87
7.4.1.	Resistencia a antibióticos	87
7.4.2.	Detección de factores de virulencia	90
7.4.3.	Actividad hemolítica.....	92
7.5.	Caracterización funcional.....	92
7.5.1.	Actividad antioxidante.....	93
7.5.2.	Actividad β -galactosidasa	93
7.5.3.	Reducción de colesterol	95
7.6.	Análisis multivariable	95
7.6.1.	Análisis de componentes principales (ACP) y mapa de calor	95
7.6.2.	Análisis de correlación.....	98
8.	CONCLUSIONES.....	102
9.	PERSPECTIVAS	103
10.	REFERENCIAS.....	104

11. ANEXOS.....	128
A.1. Capacidad de autoagregación (%) a las 2, 4, 6, 20 y 24 h de las bacterias lácticas del pulque y del control <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM.	128
A.2. Capacidad de coagregación (%) con EPEC, <i>Salmonella</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> a las 2, 4, 6, 20 y 24 h de bacterias lácticas del pulque y el control <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM.....	128
12. PRODUCTOS GENERADOS.....	130

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales bebidas fermentadas mexicanas con reportes de presencia de BAL	26
Tabla 2. Bacterias ácido lácticas utilizadas como bioconservadores en las diversas industrias de alimentos.....	29
Tabla 3. Criterios de evaluación para seleccionar microorganismos como probióticos [Basado en:121].....	36
Tabla 4. Ejemplos de probióticos comerciales pertenecientes a la familia Lactobacillaceae [149]).	45
Tabla 5. Estudios del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de aguamiel y pulque	53
Tabla 6. Mezcla de reacción para PCR con la solución Taq PCR Master Mix (QIAGEN, Alemania).....	63
Tabla 7. Cebadores utilizados para la detección de resistencia a antibióticos y factores de virulencia [13, 175].....	70
Tabla 8. Mezcla de reacción para PCR con la enzima polimeasa Phusion™ High-Fidelity DNA (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lithuania).	71
Tabla 9. Resultados de la identificación de las cepas de bacterias lácticas del pulque mediante secuenciación del gen 16S ARNr y espectrometría de masas MALDI Byotiper.	76
Tabla 10. Caracterización <i>in vitro</i> del potencial probiótico de las bacterias lácticas del pulque. Resistencia a las barreras del tracto gastrointestinal: Jugo gástrico (JG), jugo intestinal (JI), tratamiento secuencial JG/JI y presencia de lisozima; actividad antibacteriana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> ; y actividad hidrolasa de sales biliares (HSB) (0.5% BS).....	81

Tabla 11. Características de superficie celular de las bacterias lácticas del pulque: hidrofobicidad (cloroformo y hexano), autoagregación y coagregación (EPEC, <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> serovar Typhi).....	86
Tabla 12. Resistencia a antibióticos por el método de difusión en agar y actividad hemolítica de las bacterias lácticas del pulque.....	89
Tabla 13. Aspectos de seguridad de las bacterias lácticas del pulque: genes asociados a la susceptibilidad a los antibióticos y genes de factores de virulencia	91
Tabla 14. Rasgos funcionales de las bacterias lácticas del pulque: actividad antioxidante; actividad β -galactosidasa; y reducción del colesterol.....	94

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Proceso de selección de microorganismos probióticos a través del sistema digestivo (Basado en: [121])..... 34
- Figura 2.** Valores de similitud entre las muestras analizadas y la base de datos MBT Compass para la identificación microbiana por espectrometría de masas MALDI Biotyper®. 64
- Figura 3.** Diagrama del ensayo de actividad antagónica de las BAL del pulque contra microorganismos patógenos. EC, *Escherichia coli*. ST, *Salmonella enterica* serovar Typhi. LI, *Listeria innocua*. LM, *Listeria monocytogenes*. 66
- Figura 4.** Árbol filogenético de las secuencias identificadas de BAL del pulque y secuencias de referencia obtenidas de la base de datos GenBank. Las BAL del pulque están marcadas con un círculo azul y cada una tiene sus propios números de acceso. *Metallosphaera sedula* ARS120-2 se utilizó como cepa de referencia de grupo externo. 76
- Figura 5.** Actividad antagónica de la cepa UTMB4 (*Lacticaseibacillus paracasei*) en TSA contra microorganismos patógenos: EC, *Escherichia coli*. ST, *Salmonella enterica* serovar Typhi. LI, *Listeria innocua*. LM, *Listeria monocytogenes*. 82
- Figura 6.** Ejemplo de la prueba de actividad hemolítica: a) BAL (γ -hemolítico) y b) *L. monocytogenes* (β -hemolítico). 92
- Figura 7.** Fotografía ejemplificativa de la prueba de actividad hemolítica con actividad positiva β -galactosidasa. 94
- Figura 8.** Análisis de componentes principales (ACP) para las bacterias lácticas del pulque y el control positivo *Lactobacillus acidophilus* NCFM, considerando los atributos para la determinación de la actividad probiótica *in vitro*: resistencia al jugo gástrico (JG), jugo intestinal (JI), jugo gástrico/jugo intestinal (JG/JI), lisozima (LIS), así como hidrofobicidad (H; -Hex: hexano; -Clo: cloroformo), autoagregación (A) y

coagregación (C; -LM: *Listeria monocytogenes*; EC: EPEC; ST: *Salmonella enterica* serovar Typhi). 96

Figura 9. Mapa de calor para las bacterias lácticas del pulque y el control positivo *Lactobacillus acidophilus* NCFM, considerando los atributos para la determinación de la actividad probiótica *in vitro*: resistencia al jugo gástrico (JG), jugo intestinal (JI), jugo gástrico/jugo intestinal (JG/JI), lisozima (LIS), así como hidrofobicidad (H; -Hex: hexano; -Clo: cloroformo), autoagregación (A) y coagregación (C; -LM: *Listeria monocytogenes*; EC: EPEC; ST: *Salmonella enterica* serovar Typhi)..... 98

Figura 10. Diagrama de dispersión de la correlación entre las variables resistencia a sales biliares (%; SB 0.5%) [20] y producción de la enzima hidrolasa de sales biliares (mm de halo de inhibición). 100

Figura 11. Diagrama de dispersión de la correlación entre las variables producción de enzima hidrolasa de sales biliares (mm de halo de inhibición) y reducción de colesterol (%). 101

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	Análisis de componentes principales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bacterias ácido lácticas
DE	Desviación estándar
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
FAO	Food and Agriculture Organization
GRAS	Generally Recognized as Safe
HSB	Hidrolasa de sales biliares
IDR	Ingesta dietética recomendada
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMS	Organización Mundial de la salud
PCR	Polymerase chain reaction
PG	Peptidoglucano
PGH	Peptidoglucano hidrolasas
QPS	Qualified Presumption of Safety
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UAM	Universidad Autónoma Metropolitana
UFC	Unidades formadoras de colonias
UTM	Universidad Tecnológica de la Mixteca

RESUMEN

El pulque es una bebida alcohólica tradicional mexicana no destilada a la que se le atribuyen diversas funciones benéficas, principalmente asociadas con la salud gastrointestinal, lo que puede explicarse por la presencia de microorganismos probióticos en su microbiota. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la inocuidad, actividad probiótica y características funcionales de siete cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas del pulque, utilizando como control la cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Las BAL aisladas se identificaron mediante la secuenciación del gen 16S ARNr y espectrometría de masas MALDI Biotyper® como pertenecientes a tres géneros y especies diferentes de *Lactobacillaceae*: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis* y *Lacticaseibacillus paracasei*. La mayoría de las cepas mostraron resistencia a condiciones simuladas de jugo gástrico, jugo intestinal y a la presencia de lisozima (10 mg/L). Además, todas las cepas mostraron actividad hidrolasa de sales biliares (BSH) y actividad antibacteriana frente a la cepa patógena *Listeria monocytogenes*. Además, se evaluaron las características de la superficie celular de las BAL, y la mayoría de las cepas mostraron buena hidrofobicidad, autoagregación y coagregación con *Escherichia coli* enteropatógena, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* serovar Typhi. En términos de seguridad, la mayoría de las cepas fueron sensibles a los antibióticos ensayados y sólo la cepa *Lact. paracasei* UTMB4 amplificó un gen relacionado con la resistencia a los antibióticos (*mecA*). Las cepas *Lact. plantarum* RVG2 y *Lact. plantarum* UTMB1 presentaron actividad γ -hemolítica, y la presencia del gen *agg* relacionado con la virulencia sólo se identificó en la cepa *Lact. plantarum* UTMB1. Basándose en el análisis de componentes principales (ACP) y el mapa de calor, y considerando la cepa *Lact. acidophilus* NCFM como referencia probiótica, las cepas *Lacticaseibacillus paracasei* UTMB4, *Lactiplantibacillus plantarum* RVG4 y *Levilactobacillus brevis* UTMB2 fueron seleccionadas como las cepas con potencial probiótico más prometedoras. Los resultados de este estudio destacaron los rasgos probióticos, funcionales y de seguridad de las BAL aisladas del pulque, apoyando así los beneficios para la salud atribuidos a esta bebida ancestral.

ABSTRACT

Pulque is a traditional Mexican non-distilled alcoholic beverage to which several beneficial functions are attributed, mainly associated with gastrointestinal health, which can be explained by the presence of probiotic microorganisms in its microbiota. Therefore, the objective of this work was to evaluate the safety, probiotic activity, and functional characteristics of seven strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from pulque using the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* NCFM as control. The LAB isolates were identified by 16S rRNA gen sequencing and MALDI Biotyper® MS as belonging to three different *Lactobacillaceae* genera and species: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis* and *Lacticaseibacillus paracasei*. Most strains showed resistance to gastric juice, intestinal juice and lysozyme (10 mg/L). In addition, all strains exhibited bile salt hydrolase (BSH) activity and antibacterial activity against the pathogenic strain *Listeria monocytogenes*. Additionally, cell surface characteristics of LAB were evaluated, with most strains showing good hydrophobicity, auto-aggregation, and co-aggregation with enteropathogenic *Escherichia coli*, *L. monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Typhi. In terms of safety, most of the strains were sensitive to the tested antibiotics and only the *Lact. paracasei* UTMB4 strain amplified a gene related to antibiotic resistance (*mecA*). The strains *Lact. plantarum* RVG2 and *Lact. plantarum* UTMB1 presented γ -hemolytic activity, and the presence of the virulence-related gene *agg* was identified only in UTMB1 strain. Regarding the functional characterization, the tested bacteria showed good β -galactosidase activity, antioxidant activity and cholesterol reduction based on principal component analysis (PCA) and heat mapping, and considering the strain *Lact. acidophilus* NCFM as the probiotic reference, the strains *Lacticaseibacillus paracasei* UTMB4, *Lactiplantibacillus plantarum* RVG4 and *Levilactobacillus brevis* UTMB2 were selected as the most promising probiotic potential strains. The results of this study highlighted the probiotic, functional and safety traits of LAB strains isolated from pulque thus supporting the health benefits attributed to this ancestral beverage.

1. INTRODUCCIÓN

Un gran número de bacterias ácido lácticas (BAL) se han empleado para la fabricación de una amplia variedad de alimentos y bebidas fermentadas, basándose en su capacidad para mejorar sus atributos de conservación, sensoriales, nutricionales y funcionales [1, 2]. Actualmente, las BAL son ampliamente reconocidas por su capacidad de producir varias sustancias antimicrobianas, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y otras [3]. Recientemente, ha sido de gran interés la capacidad de algunas BAL, como *Lactocaseibacillus paracasei*, para reducir los niveles de colesterol en sangre en personas con hipercolesterolemia y su acción para prevenir la aterosclerosis [4].

Los mecanismos para la reducción de la hipercolesterolemia pueden estar asociados con la actividad antioxidante que induce una actividad antiinflamatoria y modula el metabolismo del colesterol. Teniendo en cuenta que la hipercolesterolemia es un importante factor de riesgo asociado a las enfermedades cardiovasculares, que a su vez son una de las principales causas de muerte en todo el mundo, el descubrimiento de nuevos fármacos o agentes terapéuticos reductores del colesterol es de suma importancia en la medicina actual [5]. En este sentido, a través de diversos estudios realizados a BAL se ha confirmado cómo cepas específicas poseen propiedades probióticas e imparten características sensoriales únicas a los productos alimenticios, lo que ha aumentado el interés científico y tecnológico en estos microorganismos [6].

Los probióticos se definen como "microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped", entre los cuales uno de los más importantes es la regulación de la microbiota gastrointestinal [7]. En este sentido, está bien documentada la capacidad de los probióticos para aliviar o prevenir algunas enfermedades humanas con base en diferentes mecanismos fisiológicos como la tolerancia a la lactosa y la mejora del sistema inmune, actividades antimicrobianas y anticancerígenas, entre otras [8, 9].

Una característica importante en la evaluación de nuevos probióticos son las propiedades de seguridad, como la resistencia de las cepas de estudio a antibióticos y la presencia de factores de virulencia en dichas cepas. En la actualidad, se sabe que tanto las propiedades probióticas como de seguridad son altamente específicas de cada cepa, por lo que una de ellas debe ser evaluada a fondo de manera particular [10, 11]. La resistencia a los antibióticos por parte de cepas microbianas se considera un problema de salud mundial y

ha ido en rápido aumento. El mecanismo principal que se ha asociado con este problema es la transferencia de genes de un microorganismo a otro. De acuerdo a esto, los microorganismos probióticos no deben contener marcadores transferibles de resistencia a los antibióticos [10, 12].

Por otro lado, la actividad hemolítica es un factor de virulencia común presente en microorganismos patógenos que les facilita a estas cepas la adquisición de hierro y causa anemia en el hospedador [12]. Otros factores de virulencia influyen en la adherencia del patógeno al tejido del hospedador, la invasión de éste, la formación de abscesos, la resistencia a los mecanismos de defensa del hospedador, así como la modulación de ésta, la secreción de citolisinas y la producción de feromonas codificadas por plásmidos [13]. Los métodos *in vitro* e *in silico* son los más rápidos para la evaluación de la seguridad de las cepas microbianas con potencial probiótico y son considerados los más adecuados antes de pasar a las evaluaciones *in vivo*.

El pulque es una bebida ancestral mexicana obtenida de la fermentación de la savia extraída de varias especies de agave (aguamiel). Se caracteriza por ser una bebida no destilada, blanca, viscosa y de baja graduación alcohólica [14, 15]. En la década de 1910 la producción de pulque sufrió un drástico desplome que estuvo asociado a la inestabilidad social y económica durante la guerra de la Revolución Mexicana y a la creciente demanda de otras bebidas alcohólicas, como la cerveza, lo que se agravó por una fuerte campaña comercial de desprestigio de las técnicas utilizadas para la elaboración del pulque. Actualmente, este producto ha recobrado un gran interés científico y público, no sólo debido a los hallazgos de sus beneficios nutricionales y funcionales, sino también como fuente de una gran variedad de cepas microbianas que están asociadas a su fermentación [15].

Numerosos estudios sobre la microbiota del pulque han destacado la notable abundancia de BAL durante la etapa de fermentación y en el producto final [15]. Estas bacterias son responsables de la fermentación láctica en el pulque y contribuyen de manera importante a las características sensoriales de la bebida. Adicionalmente, varios informes han demostrado que los microorganismos del pulque son responsables de una serie de beneficios tradicionalmente asociados a este producto, en particular los relacionados con la prevención o tratamiento de enfermedades gastrointestinales [16]. En este sentido, se han realizado numerosos estudios *in vitro* que demuestran el destacado potencial probiótico de las BAL del pulque, particularmente de cepas pertenecientes al género *Leuconostoc* y a la familia Lactobacillaceae [17, 18]. Las pruebas de actividad probiótica *in vitro* realizadas

a las cepas BAL del pulque incluyen las siguientes: resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal (pH ácido, sales biliares y lisozima), actividad inhibitoria contra patógenos transmitidos por alimentos, hidrofobicidad, resistencia a antibióticos y actividad hemolítica [17, 18, 19]. Asimismo, Castro-Rodríguez et al. [17] realizaron pruebas *in vivo*, en las que evaluaron la adhesión de 4 cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas de aguamiel a la pared intestinal de ratas Wistar macho de 3 meses de edad, reportando valores de adhesión de 79 a 83%. Sin embargo, hasta la fecha, no hay informes en la literatura sobre los beneficios potenciales en la salud humana de las cepas de pulque.

En un trabajo previo a la presente tesis, evaluamos el potencial probiótico de 11 BAL aisladas del pulque obtenido de diferentes localidades de los estados de Oaxaca y Puebla, utilizando la cepa probiótica ampliamente caracterizada *Lactobacillus acidophilus* NCFM como control positivo [20]. Las cepas fueron identificadas mediante secuenciación del gen 16S ARNr como correspondientes a las especies *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Lacticaseibacillus paracasei* y *Liquorilactobacillus ghanensis*. Las cepas ensayadas se caracterizaron por una notable resistencia a pH 2.0, 0.5% de sales biliares y prominente actividad antimicrobiana frente a las cepas patógenas *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (EPEC) y *Salmonella enterica* serovar Typhi. Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo fue realizar un estudio integral de los rasgos probióticos, funcionales y de seguridad de BAL aisladas del pulque, contribuyendo así a la revalorización de esta bebida ancestral mexicana.

2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

2.1. Bacterias ácido lácticas (BAL)

Luis Pasteur inició el estudio de la fermentación ácido láctica entre 1857 y 1863. Sin embargo, fue Joseph Lister en 1873 quien obtuvo la primera cepa pura de una bacteria ácido láctica (BAL) ("*Bacterium lactis*"). Los cultivos iniciadores para la producción de queso y leche agria se introdujeron de manera tecnificada y controlada en 1890; sin embargo, los alimentos fermentados han sido utilizados por el hombre desde hace más de 5000 años [21]. Las BAL cultivadas en condiciones estándar se caracterizan por ser Gram-positivas, no esporuladas, catalasa negativa, aerotolerantes, ácido tolerantes y organotróficas. Este grupo de bacterias se distingue por la producción de ácido láctico como un importante producto final de la fermentación de carbohidratos y pueden ser cocos o bacilos [22]. Estos microorganismos se localizan en entornos ricos en nutrientes, como carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas [23].

2.1.1. Clasificación taxonómica

Orla Jensen (1919) [24] publicó por primera vez un reporte que sentó las bases para la clasificación de las bacterias del ácido láctico. Este sistema de clasificación estuvo ligado a ciertos factores que implicaban las siguientes características: fermentación de glucosa, morfología celular, capacidad para utilizar azúcares y rango de temperatura de crecimiento óptimo. Por lo tanto, este sistema de clasificación reconocía sólo cuatro géneros de BAL: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* [25]. Las BAL también se han clasificado en diferentes géneros/especies según sus características de producción de ácido mediante la fermentación de azúcares y su crecimiento a temperaturas específicas [26].

Las BAL se pueden clasificar como organismos homofermentativos o heterofermentativos de acuerdo con su capacidad para fermentar carbohidratos [26]. Las bacterias homofermentativas, como *Lactococcus* y *Streptococcus*, producen dos moléculas de lactato a partir de una molécula de glucosa, mientras que las bacterias heterofermentativas, como *Leuconostoc*, *Wiessella* y algunos lactobacilos, generan lactato, etanol y dióxido de carbono a partir de una molécula de glucosa [26]. Este enfoque convencional para la clasificación de las BAL se basó en características fisiológicas y bioquímicas; sin embargo, recientemente, la caracterización molecular se ha convertido en una herramienta importante

para la clasificación e identificación de estas bacterias. La caracterización molecular incluye perfiles de ADN polimórfico amplificado al azar, secuenciación del gen 16S ARNr, huellas dactilares basadas en PCR y patrones de proteínas solubles y diferenciación de especies mediante ensayo de PCR múltiple mediante el uso de cebadores derivados de genes *recA* específicos [26]. Aunque las bacterias del ácido láctico incluyen más de 60 géneros, los géneros que ocurren con frecuencia en la fermentación de alimentos incluyen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Weissella*, etc. [27].

2.1.1.1. Familia Lactobacillaceae

Esta familia de bacterias incluye al género que anteriormente era denominado como *Lactobacillus*, propuesto por Beijerinck en 1901, el cual es era el género más grande dentro de las BAL: al 2020 comprendía 261 especies y subespecies, y pertenecía a los *Firmicutes*, clase *Bacilos*, orden II “*Lactobacillales*” y familia *Lactobacillaceae*, [28]. Los lactobacilos son bacilos rectos Gram-positivos que pueden llegar a agruparse en cadenas, no móviles o raramente móviles, en ocasiones pueden encontrarse en forma de cocobacilos. Estas bacterias tienen un pH máximo para su crecimiento de aproximadamente 7.2, son fermentadoras estrictas, pueden tolerar el oxígeno o vivir en ambientes anaeróbicos, crecen a temperaturas entre 37 y 45 °C, y tienen un contenido de G+C en su ADN en el rango de 32 al 53% [29, 30].

La clasificación inicial de los lactobacilos se basó en rasgos fenotípicos como la temperatura óptima de crecimiento, la utilización de carbohidratos y el espectro de metabolitos producidos [24]. Posteriormente, en el siglo XX se utilizaron criterios genotípicos y quimiotaxonómicos, que incluyen parámetros de hibridación ADN-ADN, el contenido de G+C y la estructura química del peptidoglucano (PG). A partir de 1983, se ha utilizado la similitud de los genes 16S ARNr para proporcionar esquemas filogenéticos como columna vertebral de la clasificación y nomenclatura taxonómica [31]. En la actualidad, las secuencias de genomas completos de algunas bacterias están disponibles y la comparación de los genes compartidos se utiliza como un método para la delimitación de especies bacterianas [32, 33].

Recientemente, Wittouck et al. [34] evaluaron los genomas de especies publicadas de las familias Lactobacillaceae y Leuconostocaceae basándose en genes centrales y un límite fijo de similitud genoma-genoma, reportando que cada especie era exclusiva y discontinua. Por otra parte, Zheng et al. [28] realizaron análisis filogenéticos y genómicos comparativos

de las familias Lactobacillaceae y Leuconostocaceae. Los autores reportaron que estas familias están estrechamente relacionadas y entrelazadas. Además, dos conjuntos de datos diferentes y enfoques bioinformáticos ubicaron a las Leuconostocaceae como un grupo monofilético dentro de las Lactobacillaceae. Inicialmente, la familia Lactobacillaceae comprendía los géneros *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* y *Pediococcus*; por su parte, la familia *Leuconostocaceae* comprendía los géneros *Convivina*, *Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella*. Sin embargo, debido a los resultados del estudio y a los últimos reportes en la literatura se propuso fusionar ambas en la familia Lactobacillaceae [28].

Asimismo, Zheng et al. [28] evaluaron todos los genomas disponibles del anterior género *Lactobacillus*. Los parámetros que se evaluaron fueron la filogenia del genoma central, la identidad promedio de aminoácidos por pares, los genes característicos específicos de este grupo de microorganismos, los criterios fisiológicos y la ecología de los organismos. De acuerdo a estos estudios, actualmente se sabe que el género anteriormente conocido como *Lactobacillus*, presenta un nivel de diversidad genética que excede lo que comúnmente se encuentra en otros géneros bacterianos e incluso en lo que podría encontrarse en algunas familias bacterianas [28]. Con base en este estudio, los autores propusieron reclasificar el género *Lactobacillus* en 25 géneros. Se incluyen los géneros ya existentes *Lactobacillus* y *Paralactobacillus*, además de 23 nuevos géneros que incluyen *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* y *Lentilactobacillus* [28].

La familia Lactobacillaceae constituye uno de los grupos microbianos más involucrados en la microbiología de los alimentos y la nutrición humana, por su papel en la producción y conservación de alimentos, así como por sus propiedades probióticas. Tradicionalmente, microorganismos pertenecientes a esta familia se emplean en la fabricación de productos fermentados, tales como lácteos, carnes, y vegetales, así como para la producción de alimentos funcionales probióticos. Por otra parte, estas bacterias también son utilizadas para sintetizar compuestos bioactivos y antimicrobianos [21, 23].

2.1.2. Hábitat y aplicaciones de las BAL

Las BAL son un grupo de microorganismos muy extensos que se encuentran en diversos nichos, como en productos lácteos, cárnicos y vegetales, así como en el tracto gastrointestinal y urogenital de humanos y animales, y también en el suelo y el agua [35]. En este sentido, el intestino de los mamíferos es uno de los mayores depósitos de diversidad bacteriana con alrededor de 100 billones. Al conjunto de microorganismos que habitan en este órgano se le conoce como microbiota intestinal, siendo las BAL uno de los grupos predominantes [36]. Las BAL son esenciales en muchas aplicaciones de fermentación de alimentos, como bioconservadores y como probióticos.

2.1.2.1. Bacterias ácido lácticas en la fermentación de alimentos

El consumo de productos fermentados por parte de los seres humanos posiblemente comenzó de forma involuntaria, debido a que la fermentación ocurre en la naturaleza como un proceso natural [37]. Los alimentos y bebidas fermentados se han utilizado desde mucho antes de que se tuvieran conocimientos científicos en las áreas de la microbiología y la bioquímica. En la actualidad, estas ciencias proporcionan las herramientas de investigación que permiten identificar el papel que desempeñan los microorganismos en la fermentación, así como las técnicas para mejorar la fermentación de acuerdo con los objetivos específicos de un determinado proceso. Algunos microorganismos se encuentran presentes en los sustratos de fermentación; sin embargo, éstos también pueden ser agregados como consorcios de cepas microbianas conocidas como cultivos iniciadores [38]. Los iniciadores pueden ser pequeños lotes de fermentaciones previas, que se almacenan y posteriormente se agregan a nuevos sustratos para producir una fermentación más rápida y homogénea que proporcione atributos sensoriales específicos [39, 40]

Diversos alimentos tradicionales se han desarrollado utilizando BAL. Estos microorganismos contribuyen a mejorar las características del producto e imparten ciertos atributos que podrían mejorar la aceptación del consumidor. Algunos ejemplos de alimentos fermentados a partir de BAL son kéfir, queso, mantequilla, yogur, chucrut, verduras en salmuera, masa madre, carne y bebidas fermentadas [41]. Las bebidas fermentadas se encuentran entre los alimentos fermentados más simbólicos del mundo; muchos de estos son esenciales en las dietas locales de muchas culturas y principalmente se preparan a partir de sustratos vegetales regionales [38]. En México, los pueblos de las diferentes regiones producen una gran cantidad de alimentos fermentados tradicionales, que incluyen bebidas alcohólicas y no alcohólicas a partir de diversas materias primas. Los productos

cambian entre regiones, localidades y productores, debido a los diferentes métodos de procesamiento empleados y a los distintos microorganismos usados para la fermentación [42, 43, 44]. De forma general, se destaca la investigación realizada principalmente a bebidas fermentadas mexicanas, entre las que se encuentran las siguientes: el mezcal, pulque, tejuino, pozol, chorote, colonche, saká, sendechó, balché, atole agrío, pox, sambudia, tesgüino, tepache, tuba y taberna. En la Tabla 1 se presentan las principales bebidas fermentadas tradicionales mexicanas en las cuales se ha reportado la presencia de BAL asociadas a su fermentación.

Tabla 1. Principales bebidas fermentadas mexicanas con reportes de presencia de BAL

Bebida	Fuente principal	Principales géneros de BAL reportadas	Referencias
Pozol	Maíz (<i>Zea mays</i>)	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Weisella.</i>	[45-51]
Atole agrio	Maíz (<i>Zea mays</i>)	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Weisella.</i>	[52]
Tejuino	Maíz (<i>Zea mays</i>)	<i>Lactobacillus, Leuconostoc, Streptococcus, Weisella.</i>	[53]
Tesgüino	Maíz (<i>Zea mays</i>)	<i>Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus.</i>	[54, 55]
Pulque	Maguey (<i>Agave spp.</i>)	<i>Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Weisella.</i>	[56, 57]
Tuba	Coco (<i>Cocos nucifera</i>)	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc.</i>	[58-60]
Taberna	Corozo (<i>Acrocomia acuelata</i>)	<i>Enterococcus, Fructobacillus, Lactobacillus, Lactococcus.</i>	[61]
Tepache	Piña (<i>Ananas comosus</i>)	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Weisella.</i>	[62, 63]
Colonche	Cactáceas (<i>Opuntia, Pacchycerus, Stenocereus</i>)	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Weisella.</i>	[64]
Mezcal	Maguey (<i>Agave</i>)	<i>Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Weisella.</i>	[65-67]
Chorote	Maíz (<i>Zea mays</i>) y cacao (<i>Theobroma cacao</i>)	<i>Fructobacillus, Lactobacillus, Leuconostoc.</i>	[68]

2.1.2.2. Bacterias ácido lácticas empleadas como bioconservadores

La transmisión de infecciones por alimentos es actualmente uno de los mayores problemas de salud mundial; por lo tanto, la seguridad alimentaria es una prioridad en la industria de los alimentos [69]. Una alternativa eficaz para resolver esta problemática es la utilización de técnicas de conservación de alimentos, sobre todo aquellas que garanticen el menor daño posible a los nutrientes del producto. La tecnología de obstáculos (“hurdle technology” en inglés) es la combinación de factores de conservación, tales como actividad de agua, pH, tratamiento térmico, compuestos antimicrobianos, etc. Actualmente esta tecnología se ha convertido en la alternativa más idónea para la conservación de diversos alimentos [70]. Por otra parte, se sabe que el tratamiento más utilizado para el control de enfermedades infecciosas ha sido y sigue siendo el empleo de antibióticos. Sin embargo, la resistencia a los antibióticos se ha considerado como un problema de salud pública a nivel mundial. Por otro lado, los alimentos pueden ser un vector importante para la introducción de microorganismos resistentes a los antibióticos en el trato gastrointestinal [71].

Aunado a lo anterior, en la actualidad los consumidores buscan productos con la menor cantidad de aditivos alimentarios, y el menor empleo de operaciones de procesamiento, con una tendencia de consumo actual de productos “frescos” y mínimo procesamiento. La denominada “Clean Label” o etiqueta limpia es una tendencia actual que ha obligado a la industria de alimentos a buscar nuevas opciones de conservación, entre las que más se ha estudiado es la utilización de bacterias bioprotectoras [72]. La utilización de cultivos bacterianos para la conservación de alimentos no es nueva: diversos cultivos ya son utilizados en la actualidad para extender la vida útil y mejorar la seguridad de los alimentos [73]. Sin embargo, las bacterias a utilizar deben contar con los estudios de seguridad pertinentes para poder ser aplicados en los alimentos, porque estos podrían ser una fuente potencial de transferencia de genes de resistencia a antibióticos [74].

Por lo tanto, para que un cultivo se pueda considerar bioprotector, este debe de cumplir preferentemente los siguientes requisitos: identificación a nivel de género y especie, tener el grado GRAS (generalmente reconocido como seguro) o QPS (presunción calificada de seguridad), permanecer activa en condiciones de almacenamiento, inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos o de deterioro, probar el efecto tecnológico buscado, definir la cantidad a utilizar y ser efectiva a concentraciones celulares seguras [72]. Las BAL son los cultivos más estudiados y comercializados por su capacidad bioprotectora contra patógenos como *L. monocytogenes*, entre otros, como se muestra en la Tabla 2.

A partir del concepto de bacterias bioprotectoras, surgió el término bioconservación, la cual se puede lograr no sólo con la utilización de los cultivos vivos, sino también mediante el uso de sus metabolitos antimicrobianos [72]. En este sentido, las BAL han sido ampliamente estudiadas por su capacidad de producir compuestos antimicrobianos como los ácidos orgánicos, diacetilo, peróxido de hidrogeno, enzimas y péptidos antimicrobianos (AMP, por sus siglas en inglés) [75]. Como se comentó anteriormente, la resistencia a antibióticos se está volviendo un problema cada vez más serio, por lo que es necesario buscar alternativas más seguras y efectivas de conservación de los alimentos, dado que los microorganismos empleados como iniciadores de fermentaciones de alimentos podrían convertirse en vectores para la transmisión de resistencia a microorganismos patógenos o de deterioro.

Tabla 2. Bacterias ácido lácticas utilizadas como bioconservadores en las diversas industrias de alimentos.

Productos incorporados	Bacterias bioprotectoras	Microorganismo objetivo	Referencias
Productos lácteos			
Iniciadores de quesos	<i>Lactococcus lactis</i>	Patógenos bacterianos	[76, 77]
Queso para untar	<i>Lactobacillus sakei</i> y <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	[28, 78]
Queso	<i>Staphylococcus equorum</i> ,	<i>Listeria monocytogenes</i>	[79]
Queso fresco	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Bacillus cereus</i>	[80, 81]
Queso tipo fresco	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	[82]
Suero de queso fresco	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	[83]
Jben	<i>Enterococcus durans</i> y <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	[84, 85]
Leche cruda y esterilizada	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	[86]
Leche desnatada y UHT	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	[87]
Leche UHT y entera	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	[88, 89, 90]
Queso gorgonzola	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	[91]
Queso feta	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	[92]
Crema agría	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> and	<i>Penicillium commune</i>	[73, 93]

	<i>Lactobacillus harbidense</i>		
Leche fermentada	<i>Lactobacillus harbinensis</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	[94]
Carne			
Jamón cocido	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Bacillus cerum</i>	[95]
Jamón cocido	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Clostridium spp.</i>	[95]
Salchicha fresca y salchicha fermentada	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	[96, 97]
Pechuga de pollo	<i>Enterococcus lactis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	[98]
Albóndigas	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Escherichia coli</i> 0157:H57	[99]
Carne de cordero lechal	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	[100]
Productos de panadería			
Pan integral	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	<i>Aspergillus niger</i>	[101]
Panettones	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	Hongos y levaduras	[102]
Pan de masa madre	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	<i>Bacillus spp.</i>	[103]
Pastel	<i>L. reuteri</i> and <i>Levilactobacillus spicheri</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	[104]
Panecillos de leche	<i>Lactobacillus citreum</i>	<i>Aspergillus niger</i>	[104]

Frutas y vegetales

Aceitunas de mesa, coles y manzanas	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	[105, 106, 107]
Manzanas	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Escherichia coli</i>	[107]
Manzanas	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	[108]
Pepinillos	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Candida albicans</i>	[109]
Naranja	<i>Weissella paramesenteroides</i> and <i>Liquorilactobacillus sucicola</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	[110]
Racimo de uvas	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Aspergillus niger</i> y <i>Aspergillus carbonarius</i>	[108]
Lechuga	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	[111]

Productos marinos

Salmón ahumado en frío	<i>Lactilactobacillus curvatus</i> y <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	[112]
Paté de pescado	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	<i>Vibrio</i> sp.	[113]
Hamburguesas de atún	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	[114]

2.1.2.3. Bacterias ácido lácticas probióticas

El uso de microorganismo benéficos se remonta a los tiempos de las civilizaciones ancestrales; por ejemplo, la leche agría se recetaba desde la antigüedad para curar trastornos relacionados con el estómago y el intestino [115]. Sin embargo, no fue sino hasta 1908, en que Eli Metchnikoff, un científico ruso que trabajó en el Instituto Pasteur de París, realizó la primera observación de la función positiva desempeñada por algunas bacterias ácido lácticas en la leche fermentada. Este científico atribuyó la buena salud y longevidad de la gente de Bulgaria al alto consumo de leche fermentada a la que llamaban “yahourth”. Metchnikoff también confirmó que el ácido láctico y otros productos secretados por las BAL en la leche agría inhibían el crecimiento y toxicidad de bacterias anaerobias y formadoras de esporas que se encuentran en el intestino grueso. Adicionalmente, antes de las observaciones realizadas por Metchnikoff, Henry Tissier ya había observado que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias caracterizadas por una morfología peculiar en forma de “Y” (bacterias “bífidas”); por el contrario, estas bacterias eran abundantes en niños sanos [116, 117]. A partir de estos reportes se empezaron a conocer los beneficios de las BAL como probióticos. Actualmente, se conoce que los probióticos más utilizados provienen generalmente de la familia Lactobacillaceae.

2.2. Probióticos

Actualmente sabemos que el cuerpo humano es un ambiente favorable para el desarrollo de una gran diversidad de microorganismos: tan solo en el aparato digestivo habitan normalmente más de 400 especies bacterianas. Por otro lado, el estómago es uno de los órganos con menor cantidad de bacterias (10^3 UFC/mL), debido a la presencia de jugo gástrico. A lo largo del intestino la concentración bacteriana aumenta hasta llegar a una concentración final en el colon de 10^{12} - 10^{14} UFC/mL. La microbiota intestinal se ha relacionado con diversas actividades metabólicas, que incluyen la extracción de energía y nutrientes de los alimentos, la biosíntesis de vitaminas, la transformación de sales biliares, el desarrollo de inmunidad innata y adaptativa. De esta manera, esta microbiota ayuda a mantener la integridad del epitelio intestinal, funcionando como una barrera para la colonización por patógenos microbianos y participando en el metabolismo de los medicamentos [23, 118].

El término probiótico es relativamente nuevo y significa “a favor de la vida”. Muchas han sido las definiciones propuestas; Fuller definió el término probiótico como “un suplemento

dietético a base de microbios vivos que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal”. Por su parte, Havenaar y Huis in’t Veld lo definieron como “un monocultivo o cultivo mixto de bacterias viables que, cuando se aplica a animales o seres humanos, afecta beneficiosamente al huésped mejorando las propiedades de la flora autóctona”. Una de las definiciones más adoptadas y aceptadas en todo el mundo es la propuesta por la FAO/OMS que define a los probióticos como “Microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud” [117].

En el año 2013, la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ACIPP) organizó un encuentro de expertos clínicos y científicos en probióticos, que incluían especialistas en gastroenterología, pediatría, medicina familiar, microbiota intestinal, microbiología de bacterias probióticas, genética microbiana, inmunología y ciencia de los alimentos, para discutir los temas más actuales relacionados con probióticos. En este encuentro, también participaron los miembros del Panel de Expertos de la FAO/OMS, miembros del Grupo de Trabajo de la FAO/OMS y otros expertos en el tema con reconocimiento internacional. El panel determinó que la definición aprobada por la FAO/OMS sigue siendo relevante y útil para que los científicos y reguladores definan más ampliamente las categorías de probióticos. El único señalamiento fue que una definición gramaticalmente correcta sería “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped” y apoyan el uso de esta redacción en el futuro. Esta definición captura la esencia de los probióticos como agentes microbianos, viables y beneficiosos a la salud, en la que se incluye una amplia gama de microorganismos [7].

2.2.1. Criterios de evaluación para seleccionar microorganismos como probióticos

Antes del 2002 no existían criterios acordados para el estudio de los probióticos. Posteriormente, el Grupo de Trabajo Conjunto FAO/OMS establecieron las directrices para la evaluación y declaración de probióticos para uso alimentario. El objetivo de contar con criterios de evaluación fue el agilizar el proceso y garantizar no sólo la seguridad de los probióticos sino también la veracidad de las declaraciones de los beneficios para la salud asociados con cada organismo [117]. Sin embargo, las directrices de la FAO/OMS no recomiendan técnicas específicas *in vitro* e *in vivo* para la evaluación de los productos probióticos. Desafortunadamente, en la práctica estas directrices no se regulan y no

siempre se cumplen estrictamente, por lo que el mercado se ha visto inundado de numerosos productos supuestamente probióticos cuya autenticidad es dudosa [119].

De acuerdo con la definición vigente del término probiótico, para concluir si cepas específicas califican como probióticos se utilizan 4 criterios principales: i) las cepas deben estar suficientemente caracterizadas; ii) la aplicación de las cepas debe ser segura para el uso previsto; iii) el estudio debe estar respaldado por al menos un ensayo clínico positivo en humanos; y iv) las cepas en el producto deben estar vivas en las cantidades suficientes durante toda su vida útil [120]. La selección de microorganismos probióticos requiere un enfoque sistemático, debido a que el tránsito de los probióticos en el sistema digestivo conlleva un enfoque paso a paso (Figura 1). Este enfoque consiste en una secuencia de pruebas para reducir progresivamente el número de candidatos probióticos. Al final de este procedimiento se seleccionan las cepas que presentan por una parte mayor resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal y por otro lado, aquellas que tienen el mayor número de propiedades funcionales. Adicionalmente, se busca que las cepas sino tengan ningún rasgo negativo que pueda afectar la salud del consumidor [121].

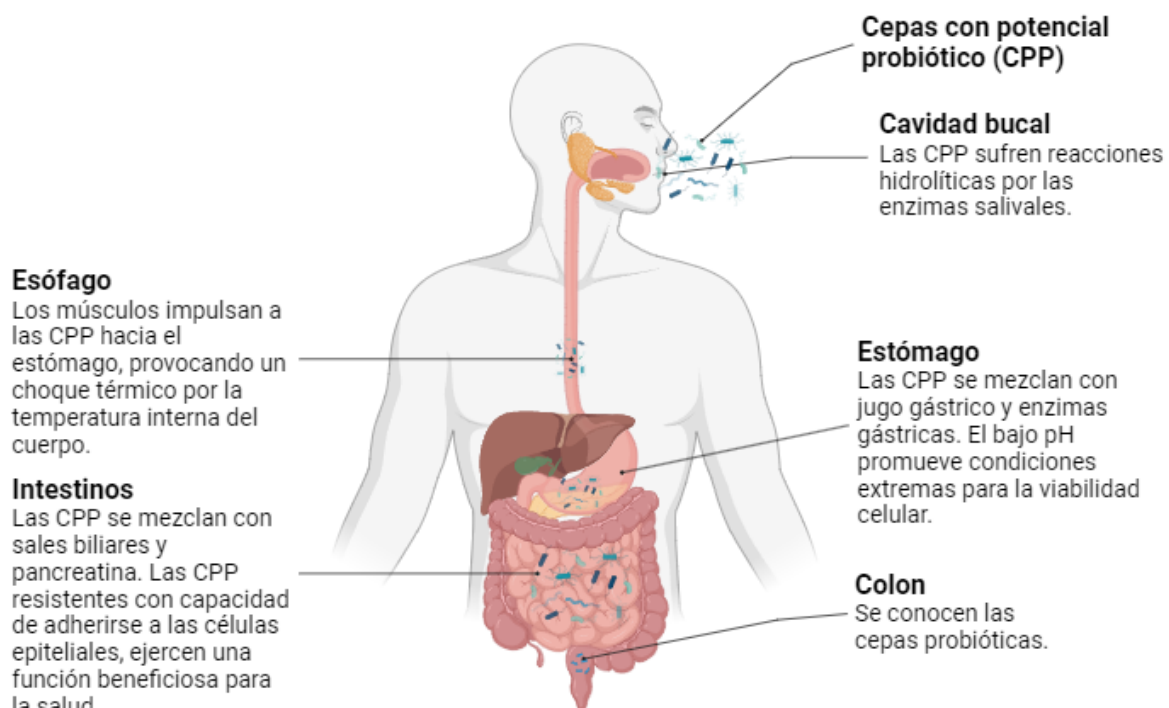


Figura 1. Proceso de selección de microorganismos probióticos a través del sistema digestivo (Basado en: [121]).

De acuerdo con la FAO y la OMS los requisitos obligatorios a evaluar en microorganismos con posible potencial probiótico se dividen en cinco categorías: tolerancia al estrés, capacidad de adhesión, actividad antipatogénica, evaluación de seguridad y ensayos clínicos (Tabla 3). Sin embargo, alternativamente se pueden evaluar otros requisitos como son: propiedades funcionales asociadas al huésped, requerimientos industriales y caracterización ómica (Tabla 3).

Tabla 3. Criterios de evaluación para seleccionar microorganismos como probióticos [Basado en:121].

Requisitos de la FAO y la OMS			
Tolerancia al estrés	Capacidad de adhesión	Actividad antipatogénica	Evaluación de seguridad
<ul style="list-style-type: none"> • Enzimas salivales • Enzimas gástricas • Temperatura corporal • pH bajo • Sales biliares • Jugo gástrico 	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayos de autoagregación • Grado de hidrofobicidad • Adhesión a células epiteliales de mamíferos 	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de metabolitos antimicrobianos • Competencia con el organismo patógeno • Coagregación con patógenos 	<ul style="list-style-type: none"> • Identificación taxonómica • Ausencia de virulencia • Producción de enterotoxinas • Actividad hemolítica • Genes transferibles de resistencia a los antibióticos <p style="text-align: center;">Ensayos clínicos</p>
Propiedades alternativas			
Propiedades funcionales asociadas al huésped	Requerimiento industrial		Caracterización ómica
<ul style="list-style-type: none"> • Anticáncer • Anticolesterol • Antidepresivo • Antiansiedad • Antiobesidad • Antidiabético • Inmunoestimulante • Secreción de moléculas funcionales 	<ul style="list-style-type: none"> • Calidad sensorial • Ensayos de viabilidad celular • Estrés por el procesamiento de alimentos • Estrés relacionado con el almacenamiento 		<ul style="list-style-type: none"> • Genómica • Metabolómica • Proteómica • Transcriptómica

2.2.1.1. Tolerancia al estrés gastrointestinal

Las cepas con potencial probiótico (CPP) se enfrentan a diversas condiciones de estrés que están presentes a lo largo de su recorrido a través del tracto gastrointestinal. La cavidad bucal es el primer contacto de las CPP con el huésped, y es donde se encontrarán con enzimas como la amilasa y la lisozima. Las bacterias Gram-positivas son generalmente sensibles a la lisozima; sin embargo, particularmente las BAL son más resistentes a estas condiciones que otras bacterias Gram-positivas, por lo que algunas BAL forman parte de la microbiota residente en la cavidad oral de los humanos [121]. De acuerdo con la literatura, la lisozima está presente en fluidos biológicos humanos como la saliva, la leche humana y el moco nasal en un intervalo de concentraciones de 1-13 mg/mL [122]. La evaluación de diferentes BAL con potencial probiótico aisladas de diferentes fuentes, en particular de la familia Lactobacillaceae, ha demostrado que la resistencia a la lisozima de este grupo bacteriano es una propiedad generalizada, que muestra una resistencia de moderada a alta (3.24 - 99.97%) a concentraciones de 0.1 a 10 mg/mL de lisozima en diversos lactobacilos aislados de saliva y sitios subgingivales [123] y de varios tipos de queso [124, 125].

Posterior a la ingesta, los probióticos se enfrentan a un leve choque térmico provocado por la temperatura interna del cuerpo, así como a factores antimicrobianos en el estómago (pH bajo, pepsina y jugo gástrico) y en los intestinos (pancreatina y sales biliares) (Figura 1) [121]. En el estómago, el pH varía desde 1.5 hasta 4 durante el ayuno y después de ingerir alimentos, respectivamente [18]. La resistencia a condiciones del tracto gastrointestinal varía de acuerdo con la especie; por ejemplo, a pH 2 y pH 3 las bacterias de la familia Lactobacillaceae son en general ampliamente resistentes, mientras que las *Bifidobacterias* son extremadamente sensibles. Por lo tanto, la tolerancia al estrés gástrico es una de las condiciones más críticas que deben cumplir las cepas probióticas, dado que el paso por el estómago es el sistema de defensa más importante del cuerpo humano contra los microorganismos externos introducidos vía oral [126]. Por otra parte, a su llegada al intestino, las BAL se encuentran con otra condición adversa: la presencia de sales biliares que puede variar de 0.2 a 2%. Sin embargo, diversos reportes coinciden en una alta tolerancia a sales biliares por parte de las BAL; lo que se ha atribuido principalmente a la producción de la enzima hidrolasa de sales biliares (HSB) por parte de las BAL [20].

Comúnmente, la tolerancia *in vitro* de resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares se evalúa en ensayos independientes. En la mayoría de los estudios, las células se exponen a un pH constante, que oscila entre 1.5 y 3, y en el caso de sales biliares entre 0.3 y 1%.

Sin embargo, *in vivo*, el pH del estómago muestra un aumento gradual de la acidez durante todo el proceso digestivo, y no todas las células están expuestas al mismo pH durante el mismo periodo de tiempo. En este sentido, los experimentos estáticos *in vitro* podrían ser mucho más inhibitorios que un proceso de digestión gástrica real [127]. Adicionalmente, las condiciones de estrés en el sistema digestivo antes mencionadas se pueden probar cultivando las cepas de interés a pH diferentes en presencia de enzimas, como la pepsina, lisozima, pancreatina y amilasa, cloruro de sodio (NaCl) y sales biliares [121]. La tolerancia a estas condiciones se evalúa principalmente por conteo en placa y se reporta como porcentaje.

2.2.1.2. Capacidad de adhesión

Se ha observado que las bacterias prefieren desarrollarse en comunidades sedentarias, preferentemente adheridas a una superficie. La tendencia de adherirse representa una ventaja que permite a los microorganismos el poder iniciar una relación simbiótica con su hospedador. Un ejemplo es el que se observa en la microbiota que habita en el tracto digestivo de rumiantes [128, 129]. La adhesión bacteriana favorece la localización de una superficie del hospedero que le provea a la bacteria de nutrientes y que le brinde protección del medio hostil circundante. La adhesión de los microorganismos en las superficies del epitelio intestinal puede prevenir que estos sean excretados del cuerpo debido al continuo paso de fluidos a través de la superficie epitelial [129].

Por lo tanto, uno de los aspectos más importantes a evaluar en las cepas candidatas a probióticos es la colonización de las células en el epitelio del tracto gastrointestinal (TGI). La adhesión de los microorganismos a las células consiste en procesos de superficie complejos que involucran dos membranas, las de las células microbianas y humanas, en los que las interacciones célula-célula dependen de la composición química y fisicoquímica de la superficie celular de la cepa probiótica. Diversos estudios sugieren que los componentes extracelulares bacterianos, así como la composición del medio circundante pueden influir en la adhesión. La adhesión de los microorganismos a las células epiteliales está relacionada con la capacidad de autoagregación y con las propiedades hidrofóbicas de la superficie de las células bacterianas. La capacidad de autoagregarse de estas células garantiza que la cepa probiótica pueda alcanzar una alta densidad celular en el intestino, y por otra parte, la hidrofobicidad de la superficie celular ayuda a mejorar la interacción entre los microorganismos y las células epiteliales humanas [121].

La prueba para determinar la capacidad de autoagregación consiste en un método en el que se mide, en varios intervalos de tiempo, la absorbancia de una suspensión de solución salina inoculada con la cepa de interés [130]. La hidrofobicidad de la superficie celular se puede medir mediante el método de adhesión microbiana a disolventes (MATS, por sus siglas en inglés), el cual consiste en mezclar la cepa bacteriana con un hidrocarburo. La hidrofobicidad se mide por densidad óptica a 600 nm (DO_{600}), por medio de un espectrofotómetro [17, 131]. Una prueba más directa de la capacidad de adhesión se realiza utilizando células epiteliales de mamíferos, como Caco-2, HT-29 y I-407 fetal [121].

2.2.1.3. Actividad antimicrobiana

Una de las características más importantes de los microorganismos probióticos es su capacidad de eliminar competidores, lo que se atribuye principalmente a que estos microorganismos pueden adherirse eficazmente a la mucosa intestinal compitiendo de esta manera con los patógenos por un nicho en el epitelio intestinal [18]. Después de la adhesión en el intestino, los probióticos producen compuestos antimicrobianos extracelulares mediante la conversión de carbohidratos, proteínas y otros metabolitos en sustancias que provocan la muerte de las bacterias patógenas. Los compuestos antimicrobianos principalmente secretados por las cepas probióticas son ácidos orgánicos, enzimas hidrolíticas, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y otros compuestos de naturaleza proteica. Otros mecanismos de actividad antagónica relevante que han sido reportados son la competencia por nutrientes, la coagregación con patógenos y la estimulación del sistema inmune [132]. La actividad antagónica y el mecanismo empleado para esta varía de acuerdo a la cepa microbiana específica.

Inicialmente, la prueba para determinar la producción de compuestos antimicrobianos se realiza en placas de agar por el ensayo de difusión, que consiste en enfrentar a las células de los microorganismos patógenos con sobrenadantes libres de células de la cepa de estudio [133]. Por otra parte, la competencia por nutrientes se evalúa mediante la inhibición de la adhesión de patógenos a líneas celulares debido a la competencia de la cepa probiótica [121]. La coagregación se considera otra actividad probiótica antagónica que proporciona aglomeración de las células patógenas con células probióticas, lo que facilita la eliminación de las primeras a través de las heces. La actividad de coagregación se puede evaluar mediante pruebas en soluciones salinas que contengan tanto la célula patógena como la probiótica. Los patógenos generalmente utilizados son *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Candida spp.*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella choleraesuis* [134].

2.2.1.4. Evaluación de seguridad

Las empresas dedicadas a la producción y comercialización de probióticos deben asegurarse de que los alimentos y suplementos dietéticos que producen cumplan con los estándares de seguridad aplicables a estos productos. Adicionalmente, es necesario evaluar el posible riesgo que conlleva el introducir microorganismos vivos en la dieta, no dando por hecho que por sus cualidades probióticas éstos son seguros. De acuerdo con la FAO/OMS, se han establecido criterios importantes para evaluar la seguridad de los probióticos para su uso en humanos. Los criterios principales incluyen registro del historial de aislamiento, identificación taxonómica, ausencia de genes de virulencia, infectividad, toxicidad y presencia de genes transferibles de resistencia [120, 121].

La mayoría de los microorganismos probióticos disponibles han sido aislados de humanos. Sin embargo, actualmente se están estudiando nuevas fuentes para aislar cepas probióticas. Después del aislamiento, el primer paso para determinar la seguridad de los microorganismos probióticos es una identificación adecuada, lo que proporciona un conocimiento preliminar sobre el potencial de patogenicidad de las bacterias de estudio. Adicionalmente, es importante considerar que los efectos de los probióticos son específicos para cada cepa, por lo tanto, es fundamental conocer la identidad de éstas. La identificación a nivel de especie se logra combinando diversas técnicas bioquímicas (crecimiento en diferentes fuentes de carbono, tinción de Gram, catalasa, nitrato reductasa y pruebas de ureasa) y genotípicas (secuenciación del gen 16S ARNr). Otro método utilizado para la identificación rápida es la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF [121, 135].

Después de tener plenamente identificada a la cepa de estudio, se deben realizar pruebas de producción de enterotoxinas, actividad hemolítica, producción de D(-)-lactato y otros factores de virulencia (actividad gelatinasa, hemolisina o ADNasas, etc.) y se debe considerar si estas características cumplen con los estándares emitidos por las autoridades internacionales. Para evaluar estos factores de virulencia/toxicidad genética se utiliza principalmente la técnica de PCR y algunos ensayos *in vitro* de toxicidad como el uso de medio de cultivo sangre para determinar la actividad hemolítica. Además, se realizan pruebas *in vivo* [121].

Otro rasgo importante de seguridad de las cepas probióticas es la resistencia a antibióticos, específicamente se busca la ausencia de genes adquiridos en estas cepas. En el año 2007, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) introdujo por primera vez la resistencia a antibióticos como un problema de salud que podría

asociarse con el consumo de probióticos [120, 121]. Desde entonces, se han realizado una gran cantidad de estudios independientes en relación a la presencia de genes asociados con la resistencia a los antibióticos en los microorganismos probióticos, debido a la posible transmisión genética de resistencia entre diferentes bacterias. La susceptibilidad o resistencia a antibióticos se puede evaluar mediante diversos métodos como la difusión en disco de agar y la difusión superpuesta de agar, la prueba E, la dilución en agar o la dilución en caldo. La prueba E y de dilución se basan en el ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC) [121].

Sin embargo, aunque este tipo de pruebas se consideran adecuadas, pueden tener una baja reproducibilidad entre laboratorios. Por lo cual, la técnica de PCR se convirtió en la más importante para detectar la presencia de genes de resistencia en bacterias probióticas debido a su alta sensibilidad y conveniencia. El ensayo de PCR consiste en amplificar con cebadores específicos los genes de resistencia a los antibióticos de ADN aislado de cepas de estudio. Posteriormente, los amplicones esperados se analizan mediante electroforesis en gel [13].

La resistencia a los antibióticos de las cepas probióticas se considera un problema de seguridad cuando existe el riesgo de que éstos últimos transfieran genes de resistencia a microorganismos patógenos. Los microorganismos pueden realizar la transferencia horizontal de genes mediante elementos móviles como plásmidos, transposones conjugativos, integrones y bacteriófagos, lo que acelera el desarrollo de cepas resistentes a los antibióticos. Por otra parte, cuando la resistencia es intrínseca, es decir, adquirida como resultado de una mutación cromosómica, las bacterias probióticas no constituyen un problema de seguridad, porque la resistencia a los antibióticos sólo se transmite a la siguiente generación a través del material genético de la bacteria. Por el contrario, las cepas con resistencia intrínseca pueden ayudar a restaurar la microbiota intestinal de individuos que fueron sujetos a tratamientos con antibióticos. Por otra parte, los probióticos resistentes a los antibióticos también podrían tener un papel importante en la prevención de la diarrea inducida por antibióticos [119, 121].

2.2.1.5. Propiedades funcionales

Además de todos los criterios anteriormente mencionados, también se pueden considerar varios asociados con los beneficios a la salud que aportan los productos probióticos. Los microorganismos probióticos pueden funcionar como agentes anticancerígenos, antiolesterol, antidepresivos, antiansiolíticos, antiobesidad, antidiabéticos,

inmunoestimuladores y como biosintetizadores de moléculas funcionales [121]. El efecto anticancerígeno se puede ejercer mediante múltiples mecanismos, que incluyen los siguientes: i) la producción de compuestos con esta actividad (ej. ácidos grasos de cadena corta); ii) la unión y degradación de mutágenos potenciales; iii) la reducción de la actividad de las enzimas involucradas en la formación de carcinógenos; iv) la reducción de micotoxinas genotóxicas, inmunosupresoras y nefrotóxicas; v) la inhibición de la proliferación de células tumorales; y vi) la inducción de la apoptosis en células cancerosas [136, 137]. La reducción de compuestos cancerígenos puede ocurrir mediante la unión física de dichos compuestos con el peptidoglucano presente en las paredes celulares de algunos microorganismos probióticos. En este sentido, estudios *in vivo* han demostrado la eliminación de compuestos cancerígenos junto con las bacterias a través de las heces. La capacidad de unión generalmente se evalúa cultivando las cepas de estudio en un medio sintético que contenga mutágenos, como nitritos, amoníaco, micotoxinas y sales biliares secundarias, y posteriormente evaluando la adsorción de estos compuestos por parte de las células. Adicionalmente, la actividad anticancerígena de los agentes probióticos se puede evaluar *in vitro* con líneas celulares de carcinoma y ensayos de antimutagenicidad [121, 138].

Por otro lado, recientemente se ha asociado a los agentes probióticos con la prevención de enfermedades cardíacas al reducir los niveles séricos del colesterol. Las pruebas de reducción de colesterol se pueden realizar mediante ensayos *in vitro*, utilizando micelas de colesterol-fosfatidilcolina, caldo MRS suministrado con colesterol o con colesterol soluble, después de lo cual se evalúa la cantidad de colesterol residual en el medio [139]. El principal mecanismo que se ha asociado a la reducción de colesterol mediada por microorganismos probióticos es la desconjugación enzimática de los ácidos biliares en el intestino humano. La mayoría de los probióticos producen enzimas HSB, las cuales convierten las sales biliares conjugadas en sales biliares desconjugadas, las cuales son más fácilmente liberadas por el organismo humano a través de las heces. La actividad HSB se puede evaluar mediante ensayos *in vitro* en placas de agar con sales biliares, o mediante PCR utilizando cebadores específicos basados en regiones conservadas de ADN que codifican para enzimas HSB. Por otra parte, los estudios *in vivo* se realizan mediante el suministro de cepas probióticas por determinado tiempo, para posteriormente realizar pruebas de detección de colesterol en sangre, orina y heces [140].

En 1974, Tannock y Savage [141] realizaron el primer reporte de la influencia de la microbiota en la depresión y ansiedad. En esta investigación se demostró que en ratones estresados las poblaciones del anterior género *Lactobacillus* se redujeron drásticamente. Es probable que el tratamiento con probióticos ayudó a mejorar el estado de ánimo de los ratones, quizás debido al efecto de los probióticos en la mejora del sistema inmunológico o en las concentraciones de serotonina. La selección de cepas probióticas con actividad antidepresiva se ha realizado mediante pruebas *in vivo* en modelos de ratas, evaluando la actividad inmune y neuroendocrina, así como sobre las neuronas monoaminérgicas centrales. Las cepas con mayor potencial en las pruebas en modelos de ratas se pueden investigar más a fondo en estudios clínicos [142].

Otra actividad relacionada a los probióticos es la actividad antiobesidad y antidiabética, debido a que éstos pueden suprimir el aumento de peso corporal y la resistencia a la insulina. El mecanismo asociado a estas actividades por parte de los probióticos es la modulación de la composición de la flora intestinal y la inducción de la síntesis de hormonas intestinales, tales como el péptido-1, similar al glucagón, y el polipéptido inhibidor gástrico [143]. Estudios *in vivo* han demostrado el potencial de algunas cepas probióticas para prevenir la diabetes tipo 2 y el aumento de peso [144]. Las actividades antiobesidad y antidiabéticas se pueden evaluar mediante diferentes criterios de selección *in vitro*, tales como la capacidad de descomponer los lipopolisacáridos, la modulación de la producción de citocinas por las células mononucleares de sangre periférica, y la inhibición de la activación de los mastocitos. Las cepas de estudio con mayor actividad *in vitro* se pueden analizar más a fondo en estudios con animales y ensayos clínicos en pacientes con diabetes u obesidad [121].

Adicionalmente, los probióticos pueden tener actividad inmunoestimuladora. Entre los mecanismos relacionados a esta actividad están los siguientes: el aumento de las inmunoglobulinas secretoras, la fagocitosis de patógenos y la producción de citocinas. La supresión inmune inducida se puede evaluar a través de la producción de células secretoras de inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina M (IgM) [121, 145]. Por último, se ha reportado que los probióticos también son capaces de secretar diversas moléculas funcionales como antioxidantes, enzimas, ácidos grasos de cadena corta, péptidos, vitaminas esenciales y minerales, que confieren beneficios a la salud del huésped [121].

2.2.1.6. Requerimientos industriales

Los probióticos generalmente son utilizados como ingredientes fortificantes en alimentos o como suplementos dietéticos [119]. Por lo tanto, estos productos no deben tener efectos adversos en el sabor o en el aroma del producto, y tampoco aumentar la acidez a lo largo de la vida útil del producto. Entre los factores industriales y tecnológicos que se deben tomar en cuenta para el desarrollo y comercialización de estos productos están los siguientes: sobrevivencia a los factores de estrés del procesamiento de alimentos, como la fermentación, la liofilización o la encapsulación, y las variaciones de temperatura, pH, así como el estrés oxidativo y osmótico durante el almacenamiento [121].

2.2.1.7. Caracterización ómica

Actualmente se cuentan nuevas tecnologías de alto rendimiento como son las técnicas ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica). Estas nuevas técnicas permiten el desarrollo de modelos predictivos para la selección precisa y eficiente de microorganismos con actividad probiótica efectiva [119]. Por otra parte, la secuenciación de los genomas de los microorganismos probióticos ha permitido tener mayor información genética no solo del potencial probiótico de cepas bacterianas específicas, sino también de sus características funcionales y de seguridad. Por medio del estudio y mapeo de los genomas de microorganismos probióticos se han reportado genes relacionados al estrés por ácidos orgánicos y sales biliares, la capacidad de adhesión y la secreción de sustancias antimicrobianas. De acuerdo con lo anterior, la información obtenida con las técnicas ómicas se puede utilizar como evidencia científica sólida para la evaluación objetiva de los microorganismos con potencial probiótico. Estas herramientas también pueden mejorar la evaluación de los aspectos de seguridad de las cepas probióticas. En este sentido, se han reportado genes relacionados con la resistencia a los antibióticos y a la producción de metabolitos tóxicos para el huésped [121, 146].

2.2.2. Probióticos comerciales

Diversos microorganismos probióticos se producen actualmente a escala comercial; entre estos se destacan los productos a base de *Bifidobacterias* y de BAL pertenecientes a la familia Lactobacillaceae [147]. Adicionalmente, se han lanzado al mercado otros microorganismos probióticos menos comunes que incluyen bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus* y *Escherichia* y la levadura del género *Saccharomyces* [148, 149]. Las cepas pertenecientes a la familia Lactobacillaceae

constituyen el grupo microbiano más amplio de los probióticos comerciales. En la Tabla 4 se presentan algunos ejemplos de probióticos comerciales pertenecientes a esta familia, los beneficios asociados a ellos, así como la información del producto comercial.

Tabla 4. Ejemplos de probióticos comerciales pertenecientes a la familia Lactobacillaceae [149]).

Bacteria probiótica	Beneficios a la salud	Producto	Compañía
<i>Lact. rhamnosus</i> GG	Alivio de la diarrea por rotavirus, prevención de la diarrea del viajero, colitis por <i>Clostridium difficile</i> y la dermatitis atópica.	NR	Chr. Hansen Holding A/S
<i>Lact. plantarum</i> 299v	Mejora los síntomas del síndrome del intestino irritable, aumenta la absorción de hierro.	Probio Digestis® y Probi Ferrosorb®	Probi AB
<i>Lact. casei</i> Shirota	Restaura la microbiota intestinal, mejora la digestión.	Yakult®	Yakult Honsha Co. Ltd
<i>Lact. casei rhamnosus</i> Lcr 35	Restaura la microbiota vaginal después de un tratamiento con antibióticos que son la para la vaginosis bacteriana, tratamiento en el estreñimiento crónico.	Ginophilus®	Probionov
<i>Lact. johnsonii</i> La1	Controla la infección por <i>Helicobacter pylori</i> y molestias estomacales.	SVELTY® Gastro protect y LC1 Yogurt®	Nestlé
<i>Lact. casei</i> defensis DN-114001	Reducción de la prevalencia de diarrea asociada a antibióticos.	Actimel®	Danone
<i>Lact. acidophilus</i> LA-5	Previene infecciones gastrointestinales y del	PROBIO-TEC®	Chr. Hansen Holding A/S

	tracto respiratorio inferior, ayuda a recolonizar la microbiota intestinal.		
<i>Lact. acidophilus</i> NCFM	Mejora los síntomas de los trastornos intestinales.	HOWARU®	Danisco A/S

NR. No reportado

2.3. Pulque

El pulque es una bebida alcohólica no destilada producida por la fermentación espontánea del aguamiel, el cual se extrae de diferentes especies del género *Agave* (*Agave americana*, *A. atrovirens*, *A. mapisaga* y *A. salmiana*), que también son conocidos como “magueyes pulquero”. Este producto se caracteriza por ser una bebida blanca, con un contenido de alcohol entre 4 y 7°, no clarificada, ácida y de aspecto viscoso [14, 15].

El pulque es considerado un ícono gastronómico y cultural mexicano: de acuerdo con vestigios arqueológicos es probablemente la bebida alcohólica más antigua. Los aztecas lo llamaron vino *metoctli* o vino de *agave* (del náhuatl *metl* = *agave* o maguey + *octli* = vino), así como *iztacoctli* o vino blanco (de *izac*, blanco y *octli*, vino). Diferentes leyendas atribuyen el origen del pulque a la civilización Tolteca establecida en la ciudad de Tula. Sin embargo, fueron los aztecas quienes desarrollaron un pleno dominio de las técnicas de producción de aguamiel y pulque y establecieron las pautas morales para el consumo y el uso religioso del pulque [150].

Desde el año 1779, la producción y comercialización de pulque se convirtió en una de las actividades económicas más importantes de la Nueva España. Sin embargo, el pulque pasó por dos etapas críticas, durante el movimiento de independencia (1810-1821) y al inicio del movimiento revolucionario (1910). Después del movimiento de independencia, la agroindustria pulquera floreció y alcanzó su mejor momento al comienzo del siglo XX, con una producción anual de 500 millones de litros de pulque obtenidos de alrededor de 140 millones de plantas de agave. Sin embargo, al inicio del movimiento revolucionario, factores como la inestabilidad social, la introducción de compañías cerveceras y una fuerte campaña comercial de desprestigio causaron el declive de la industria pulquera [15].

En México la mayor producción de pulque se lleva a cabo de manera artesanal. La fermentación del aguamiel inicia de manera muy lenta desde la cavidad de la planta, donde se pueden encontrar diversos microorganismos nativos, como son levaduras, bacterias ácido lácticas, bacterias productoras de etanol y bacterias productoras de exopolisacáridos. Las variables principales que determinan el tiempo de fermentación son la temperatura del ambiente, los tipos de microorganismos presentes y la concentración del inóculo iniciador usado para fermentar el aguamiel [14].

El aguamiel se extrae de agaves maduros que han alcanzado entre 8 y 10 años de edad, y que están a punto de producir su inflorescencia (quiote). La maduración varía en función de diversos factores, como son la especie, las condiciones climatológicas y la presencia de nutrientes en el suelo. El proceso de producción comprende cuatro etapas principales: 1) castración, 2) raspado de cajete y extracción de aguamiel, 3) preparación de inóculo, y 4) fermentación [14, 15].

Actualmente, la mayoría de las plantaciones de maguey pulquero se encuentran en los estados de Hidalgo, México, Tlaxcala y Puebla; sin embargo, también se pueden encontrar producción de pulque en menor cantidad en estados como Ciudad de México, Coahuila, Oaxaca, Veracruz y Morelos [151]. En el año 2013, la producción de pulque presentó su segundo mayor pico de producción (~504 millones de litros, producidos en Hidalgo) después de la obtenida en 1987 (550 millones de litros, producidos en el Estado de México). De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en el año 2017 la producción de maguey pulquero fue de 217.7 millones de litros, destacando el estado de Hidalgo que aportó un 69.6% de esta producción [152]. Asimismo, en el año 2016 los principales estados productores de aguamiel fueron los siguientes: Hidalgo, con una producción de 194,579 toneladas (78.1%); Tlaxcala con una producción de 38,328 toneladas (15.4%); Puebla que registró una producción de 10,349 toneladas (4.2%); y el Estado de México con 4.13 toneladas (1.7%) [153]. Sin embargo, en el año 2019 se reportó una disminución del 66% (~171 millones de litros) en comparación con la producción del 2013. Durante los últimos 10 años el estado de Hidalgo se ha constituido como la principal zona de producción de pulque, aportando en promedio un 73% de la producción nacional (SIAP, 2021) [154].

2.3.1. Microbiología del pulque

El aguamiel es un medio que favorece el crecimiento de microorganismos provenientes del ambiente que rodea la planta de maguey: las paredes del cajete, el aire, el polvo, los insectos, la cubierta del cajete y las herramientas utilizadas durante el proceso de producción. A través de estas interacciones se favorece la inoculación espontánea del aguamiel y el comienzo de los diversos procesos fermentativos que conducen a la producción del pulque. La producción de pulque implica tres tipos de fermentación: ácida, alcohólica y viscosa. Por lo tanto, la diversidad de microorganismos asociados es compleja [15].

Sánchez-Marroquín y Hope realizaron los primeros estudios sobre la microbiota del pulque e informaron la presencia de BAL homo y heterofermentativas, identificadas como *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc mesenteroides* y *L. dextranicum*, y de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (identificada como *S. carbajali*) y la α -Proteobacteria *Zymomonas mobilis* (identificada como *Pseudomonas lindneri*) [155]. Los investigadores propusieron que estos microorganismos son esenciales en el proceso de fermentación del pulque. Estos microorganismos producen los metabolitos distintivos durante la fermentación del pulque: ácido láctico por *Lactobacillus sp.* y *Leuconostoc sp.*; etanol como resultado de la fermentación alcohólica y principalmente asociado a *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*; y exopolisacáridos (EPS) producidos a partir de sacarosa por *Leuconostoc sp.* y *Z. mobilis* [155, 156].

La microbiología del pulque es compleja que como se ha comentado anteriormente produce diferentes tipos de fermentaciones; alcohólica, ácido láctica y viscosa. Sánchez-Marroquín et al. [157] utilizaron cepas aisladas de las especies mencionadas anteriormente como un inóculo mixto para la fermentación controlada del aguamiel. Los investigadores reportaron que la fermentación combinada de estos microorganismos en aguamiel estéril producía un producto final comparable en contenido de alcohol, viscosidad y acidez al pulque tradicional. Sin embargo, en estudios posteriores sobre la microbiología del pulque se ha podido identificar una diversidad de bacterias y levaduras mucho más amplia de la planteada por estos autores. De acuerdo con las principales características metabólicas de los microorganismos del pulque, éstos se han categorizado como: i) bacterias productoras de ácido, como BAL y bacterias del ácido acético (BAA); ii) microorganismos productores de alcohol, donde se incluyen *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*; iii) bacterias productoras de dextrano, como *L. mesenteroides*; y iv) microorganismos asociados a la descomposición.

Escalante et al. [158] estudiaron la diversidad bacteriana de tres muestras diferentes de pulque mediante el análisis de secuencias del gen 16S ARNr. Las muestras fueron provenientes de Aculco en el Estado de México, Huitzilac en Morelos y Tizayuca en Hidalgo. Los autores informaron que el grupo predominante de microorganismos fue el de las bacterias ácido lácticas (BAL), presentes en un 81%. Con este estudio se demostró la presencia de especies comunes y especies únicas en cada una de las tres muestras de pulque analizadas. En otro estudio, Escalante et al. [159] estudiaron la dinámica de crecimiento microbiano durante la fermentación. Los investigadores reportaron que al final de la fermentación, la población bacteriana estuvo principalmente compuesta por *Lact. acidophilus*, *L. mesenteroides*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* y por la proteobacteria *Acetobacter malorum*. Con este estudio se puede inferir que la población durante el proceso de fermentación cambia drásticamente debido a los cambios en el ambiente que estos microorganismos producen en el aguamiel, así como por las condiciones de la fermentación y de la microbiota inicial.

En la actualidad, la microbiología del pulque ha sido estudiada por diversos investigadores utilizando técnicas de secuenciación masiva. Chacón Vargas et al. [16] realizaron la secuenciación metagenómica masiva de cinco muestras de diferentes etapas del proceso de fermentación del pulque. En este estudio los autores caracterizaron la diversidad microbiana y funcional de las diferentes etapas del proceso. Los investigadores reportaron que los géneros predominantes en las diferentes etapas del proceso fueron: *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Saccharomyces* y *Zymomonas*. Por otra parte, las especies predominantes fueron: *Acinetobacter boissieri*, *Acinetobacter nectaris*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc gelidum*, *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*. Los autores también reportaron la variación en la abundancia de los géneros y especies a medida que avanzó la fermentación, señalando que dichos cambios podrían estar asociados a la disminución de la sacarosa y al aumento del etanol y del ácido láctico a lo largo del proceso.

2.3.2. Beneficios del pulque

De acuerdo con la farmacopea tradicional, tanto el consumo del aguamiel como el de pulque se han relacionado con diversos beneficios nutricionales desde tiempos prehispánicos, a pesar del contenido de alcohol de la bebida fermentada [15]. El primer estudio de los

beneficios nutricionales asociados al consumo de pulque fue realizado en la población indígena Otomí del Valle del Mezquital (Estado de Hidalgo) en 1946. Los investigadores analizaron a 100 consumidores adultos, en un intervalo de estudio de 7 días. Con los resultados obtenidos en dicho estudio los autores concluyeron que el consumo diario de pulque aporta calorías (12%), proteína (6%), tiamina (10%), riboflavina (24%), niacina (23%), vitamina C (48%), calcio (8%) y hierro (51%). Estos resultados indican que, para este grupo étnico, el consumo de pulque constituye el segundo alimento más importante en su dieta básica después de la tortilla. Se destaca de este estudio el aporte de vitamina C a través del pulque, considerando principalmente el carácter marginal de la dieta de esta población indígena [160].

En otro estudio, Sánchez-Marroquín y Hope [155] determinaron los contenidos de algunas vitaminas en el pulque ($\mu\text{g}/100\text{ mL}$): 65.2 de ácido pantoténico, 30.7 de tiamina, 21.6 de ácido p-amino benzoico, 23 de piridoxina; incluyendo también 19.6 ng/100 mL de pulque de biotina. Diversos estudios han demostrado los beneficios nutricionales del pulque, entre los que se destaca este producto como una buena fuente de energía, vitaminas y aminoácidos esenciales. Por otro lado, otros estudios demostraron que después de la tortilla de maíz y las legumbres, el pulque era la tercera fuente más importante de hierro, ácido ascórbico, riboflavina y otras vitaminas del complejo B. Adicionalmente, el pulque aporta cantidades importantes de folato y saponinas esteroides, compuestos que tienen propiedades bioactivas [161].

Backstrand et al. [161] estudiaron la relación del pulque con el nivel de hierro en una población rural de la sierra central de México (Valle de Solís). En el estudio se evaluó la ingesta de alimentos durante 12 meses de 125 mujeres no embarazadas con edades entre 16 y 44 años. Los autores reportaron que el nivel de hierro determinado después del análisis de sangre mostró concentraciones plasmáticas más altas de ferritina asociadas con ingestas significativas de hierro no hemo y ácido ascórbico. Con este estudio se demostró que un nivel más alto de hierro se correlacionaba con una ingesta significativa de pulque.

En un trabajo similar estudiaron el consumo de pulque en 70 mujeres embarazadas de Valle de Solís, el 72.9% de las mujeres consumieron pulque durante todo el embarazo y el 75% continuó consumiendo durante el posparto [162]. En este estudio se reportó que el consumo de 0.5 L de pulque, cantidad que comúnmente es la que consumen las mujeres de esta localidad, aportó 24 g de etanol, 9% de energía, 42.9% de ácido ascórbico, 6.7% de tiamina, 5.9% de riboflavina y 14.6% de hierro de la ingesta dietética recomendada (IDR) mexicana

durante el embarazo. Estos autores demostraron una asociación entre el consumo de pulque durante la lactancia y el crecimiento robusto del recién nacido, sugiriendo que existió un efecto benéfico del consumo moderado de pulque asociado probablemente al contenido de micronutrientes de la bebida. Sin embargo, los autores también concluyeron que la ingesta temprana de pulque durante el embarazo y la lactancia resultó en una reducción en la altura y peso de los infantes [163].

Desde la época prehispánica, se ha asociado el consumo de pulque no sólo a los beneficios nutricionales que aportan en la alimentación, sino también a sus usos en la medicina tradicional. En este sentido, el pulque se ha usado ampliamente en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Actualmente, con el auge de los estudios de alimentos funcionales, estos efectos benéficos pueden explicarse por la actividad probiótica y prebiótica de los componentes del pulque [15].

2.3.3. Bacterias del pulque con potencial probiótico

Actualmente, el aislamiento y caracterización de BAL con potencial probiótico a partir de productos no lácteos ha cobrado importancia para la formulación de alimentos funcionales que promuevan la salud [164]. Los productos probióticos no lácteos ofrecen importantes ventajas como alternativa a sus homólogos de naturaleza láctea como son la ausencia de colesterol y de sustancias alergénicas propias de los lácteos [165]. La resistencia natural de las BAL del pulque al pH final y al contenido de alcohol de este producto fermentado, sugieren que estas bacterias son candidatas potenciales a probióticos [15]. De acuerdo a esto, diversos investigadores han evaluado el potencial probiótico de las bacterias ácido lácticas del pulque (Tabla 5).

De acuerdo con lo reportado en la literatura, Castro-Rodríguez et al. [17] publicaron un estudio relacionado con el potencial probiótico de BAL de aguamiel, sustrato que se utiliza para la producción de pulque. Los investigadores estudiaron 4 BAL del aguamiel identificadas por el gen 16S ARNr como *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (SD23, SD1, SF2 y SF3), y evaluaron estas cepas por su capacidad de resistir a condiciones de estrés del tracto gastrointestinal como pH ácido, sales biliares (SB) y jugos gástricos e intestinales. Asimismo, en el estudio también se realizaron pruebas de adhesión como hidrofobicidad, adhesión a pared intestinal y adhesión a mucina, así como ensayos de resistencia a antibióticos, actividad hemolítica y actividad antimicrobiana. Los autores

reportaron sobrevivencia del 40% al 50% a pH 2 y del 88% al 89% a 0.5% de SB. Sin embargo, los sucesivos pasajes a través de jugos gástricos e intestinales causaron una reducción muy drástica de las cepas de estudio: la cepa identificada como SD23 obtuvo el mayor porcentaje de sobrevivencia con 27% después de 30 min y 16% después de 90 min. Por otra parte, los autores evaluaron la adhesión de las cepas a la pared intestinal utilizando como modelo el intestino de ratas Wistar macho de 3 meses, dando como resultado porcentajes de adhesión de 79 a 83%, superiores a los presentados por el control probiótico *Lact. plantarum* 299v.

En el mismo estudio, Castro-Rodríguez et al. [17] evaluaron la hidrofobicidad de las células BAL mediante ensayos con cloroformo y n-hexadecano, reportando valores entre 13% y 85% y 25% y 84%, respectivamente. Las cepas estudiadas presentaron porcentajes de adhesión a mucina significativamente similares a la cepa probiótica *Lact. plantarum* 299v. Adicionalmente, las cepas estudiadas mostraron actividad antagónica contra los patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes*. Por otra parte, los aislados presentaron resistencia contra dicloxacilina, pefloxacina, trimetoprima y ceftazidima; que constituyen sólo 4 de los 12 antibióticos probados. Además de esto, como prueba de seguridad adicional, las cepas BAL fueron estudiadas por su actividad hemolítica dando un resultado negativo.

En otro estudio, González-Vázquez et al. [166] aislaron, identificaron y caracterizaron de forma parcial la cepa BAL *Lact. casei* J57 y probaron la capacidad de la cepa para resistir a condiciones simuladas de estrés del tracto gastrointestinal utilizando la cepa *Lact. casei* Shirota como control probiótico. Los investigadores evaluaron la capacidad de la cepa para resistir a pH 1.5, 0.3% de SB y jugo gástrico; asimismo, en el estudio se evaluó la resistencia de la cepa a antibióticos, la actividad hemolítica y la actividad de la enzima HSB. La cepa de estudio presentó alrededor de 60% de resistencia a pH ácido, 55% de tolerancia a jugo gástrico y entre 50% y 70% de sobrevivencia en presencia de sales biliares. En el estudio, los autores reportaron que la cepa no presentó actividad hemolítica y sólo mostró resistencia a un antibiótico (cefepima). Adicionalmente, la cepa estudiada mostró actividad de la enzima hidrolasa de sales biliares. Como resultado relevante del estudio, los autores concluyeron la cepa de estudio fue superior en todas las pruebas realizadas a la cepa probiótica comercial *Lact. casei* Shirota.

Tabla 5. Estudios del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de aguamiel y pulque

BAL estudiadas	Origen	Pruebas realizadas	Referencias
4 cepas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Aguamiel	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a pH 2 • Resistencia a 0.5% de SB • Tolerancia a jugo gástrico e intestinal • Adhesión a mucosa intestinal • Hidrofobicidad (cloroformo y n-hexadecano) • Adhesión al ensayo de mucina • Actividad antimicrobiana • Resistencia a antibióticos • Actividad hemolítica 	[17]
<i>Lact. casei</i> J57	Pulque	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a pH 1.5 • Resistencia a 0.3% de SB • Tolerancia a jugo gástrico • Resistencia a antibióticos • Actividad hemolítica • Actividad hidrolasa de sales biliares 	[166]
14 cepas: <i>Lact. brevis</i> (4) <i>Lact. plantarum</i> (4) <i>Lact. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> (3) <i>Lactobacillus composti</i> (2) <i>Lact. sanfranciscensis</i> (1)	Pulque	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a lisozima (10 mg/L) • Resistencia a pH 2 • Resistencia a 0.3% de SB • Hidrofobicidad (cloroformo y acetato de etilo) • Adhesión a células HT-29 y HT-29-MTX • Actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> en ratones 	[19]
14 cepas: <i>Lact. collinoides</i> (9) <i>Lact. brevis</i> (5)	Aguamiel	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a un modelo <i>in vitro</i> de simulación del tracto gastrointestinal • Resistencia a antibióticos • Actividad hidrolasa de sales biliares • Evaluación <i>in vivo</i> sobre colesterol 	[167]

<i>L. mesenteroides</i> P45	Pulque	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a lisozima (100 mg/mL) • Resistencia a pH 2.5 • Resistencia a 0.3% y 1% de SB • Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> 	[18]
11 cepas: <i>Lact. brevis</i> (1) <i>Lact. plantarum</i> (3) <i>Lact. paracasei</i> (5) <i>Lact. ghanensis</i> (2)	Pulque	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a pH 2 • Resistencia a 0.3% y 0.5% de SB • Actividad antimicrobiana • Producción de péptidos antimicrobianos 	[20]

Por otra parte, Torres-Maravilla et al. [19] aislaron e identificaron BAL de pulque de tres pueblos del centro de México: Nanacamilpa, Santiago Villalta y Milpa Alta. Los investigadores identificaron 14 cepas BAL en total, las cuales identificaron como *Lact. brevis* (4), *Lact. plantarum* (4), *Lact. paracasei* spp. *paracasei* (3), *Lact. composti* (2), y *Lact. sanfranciscensis* (1). Adicionalmente, en el mismo estudio los autores caracterizaron el potencial probiótico de las cepas aisladas mediante la evaluación de su capacidad de supervivencia en presencia de lisozima, alta acidez (pH = 2) y con la adición de 0.3% sales biliares, obteniendo los siguientes resultados: entre 1 y 97%, 41 y 89% y 4 y 87%, respectivamente para los diferentes ensayos. Por su parte, las cepas presentaron porcentajes de hidrofobicidad entre 1 y 95% y 5 y 80% con acetato de etilo y hexano, respectivamente. De forma general, las BAL de estudio presentaron baja capacidad de unión a células HT-29 (~0.3%, como mejor resultado) y a células HT-29-MTX (10.8%, como mejor resultado). En ambos ensayos, la capacidad de unión de las BAL aisladas fue mayor que la de la cepa control (*Lact. casei* BL23).

Adicionalmente, estos autores seleccionaron tres de las cepas aisladas para evaluar sus efectos protectores en un modelo de colitis murina inducida: *Lact. plantarum* LBH1064 y *Lact. sanfranciscensis* LBH1068 (Santiago Villalta), que fueron las cepas antiinflamatorias *in vitro* de mejor rendimiento, y la cepa *Lact. composti* LBH1072 (Nanacamilpa), que tuvo un rendimiento intermedio, pero que se consideró interesante probar ya que es la primera vez que se aisló dicha cepa del pulque. Los investigadores reportaron que en el experimento *in vivo* las cepas estudiadas disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) la hiperpermeabilidad

intestinal. La cepa *Lact. sanfranciscensis* LBH1068 mejoró la salud de los ratones, como se observó mediante una reducción de la pérdida de peso, disminuciones significativas en la permeabilidad intestinal y la modulación de citoquinas.

En otro estudio, Reyes-Nava et al. [167] aislaron 14 cepas BAL a partir de muestras de aguamiel provenientes de Huitzilac (Morelos), Jocotitlán (Estado de México) y Singuilucan (Hidalgo), además evaluaron el uso de ácidos biliares como estrategia de selección de las cepas con potencial probiótico. Las BAL fueron identificadas como *Lact. collinoides* (9) y *Lact. brevis* (5). Los investigadores sometieron a las cepas de estudio a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, reportando que sólo 2 BAL de la muestra proveniente de Huitzilac fueron resistentes a las condiciones de simulación del tracto gastrointestinal. De acuerdo a los autores, las cepas seleccionadas fueron capaces de disociar sales biliares conjugadas por la presencia de diversas hidrolasas de sales biliares. En este estudio, también se evaluó la resistencia de las bacterias de estudio a diversos antibióticos, con algunos aislados presentando resistencia a los antibióticos dicloxacilina, pefloxacina y ceftazidima. Adicionalmente, los autores reportaron que la cepa aislada *Lact. brevis* Lb9H mostró *in vivo* un efecto protector del daño hepático, así como actividad preventiva de intoxicación por LPS+D-GalN, que es un indicador de peroxidación lipídica.

Por su parte, Giles-Gómez et al. [18] evaluaron el potencial probiótico *in vitro* e *in vivo* de la cepa *Leuconostoc mesenteroides* P45 aislada de pulque. Los autores realizaron ensayos *in vitro* de resistencia a condiciones del tracto gastrointestinal (lisozima, pH ácido y sales biliares) y actividad antimicrobiana contra patógenos. La cepa de estudio fue expuesta a 100 mg/mL de lisozima durante 30 y 120 min, con una sobrevivencia de 90 y 71%, respectivamente. Adicionalmente, la cepa fue sometida a un pH de 2.5 por 24 h a 37 °C, presentando una sobrevivencia del 75%, que fue mayor a la presentada por la cepa control *Lact. casei* Shirota (48%). Por otra parte, la cepa fue evaluada a 0.3% y 1% de sales biliares por 24 h a 37 °C, resultando en una sobrevivencia del 100% en ambos casos. Adicionalmente, la cepa presentó actividad antimicrobiana *in vitro* contra *E. coli* enteropatógena, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhi y Thyphimurium. Por último, los autores realizaron un ensayo *in vivo* en 18 ratones hembra y machos de 8 semanas de edad; a los cuales se les administró una dosis de la cepa *L. mesenteroides* P45 de 2×10^9 UFC/día durante 7 días. En el día 8, se les administró a los ratones la cepa patógena *S. Typhimurium* L133 en una concentración de 1×10^7 UFC/día por medio de una sonda gástrica. Los autores reportaron que la administración de la cepa *L. mesenteroides* P45 fue

capaz de disminuir la infección del patógeno en al menos un ciclo logarítmico durante un periodo de 3 días.

Ruiz-Ramírez et al. [20] evaluaron el potencial probiótico y la producción de péptidos antimicrobianos *in vitro* de 11 cepas ácido lácticas aisladas de pulque, además de la cepa probiótica ampliamente caracterizada *Lact. acidophilus* NCFM como control positivo. Las once cepas mostraron resistencia a condiciones de acidez (pH 2) y sales biliares (0.3 y 0.5%), presentando porcentajes de sobrevivencia de 61 a 88% y de 66 a 97%, en dichas pruebas, respectivamente. Además de esto, las 11 cepas mostraron actividad antimicrobiana por el ensayo de difusión en agar contra los patógenos: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhi. Por otra parte, mediante el método de mancha en el césped y pruebas de hidrolisis con extractos enzimáticos semipurificados se determinó que ocho de las cepas con actividad antimicrobiana debían dicha actividad a la producción de péptidos antimicrobianos: pudiendo tratarse de bacteriocinas o de peptidoglucano hidrolasas.

3. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo diverso de microorganismos, cuya característica principal es la producción de ácido láctico como un importante producto final de la fermentación de carbohidratos. Este grupo de microorganismo se pueden encontrar en diversos hábitats, tales como productos lácteos, cárnicos y vegetales, así como en el tracto gastrointestinal y urogenital de humanos y animales. Actualmente, las BAL se emplean en la elaboración de una diversa variedad de alimentos y bebidas fermentadas, gracias a que estas bacterias tienen la capacidad de mejorar algunos atributos de estos productos tales como la vida de anaquel, así como las características sensoriales, nutricionales y funcionales. Además, se sabe que algunas cepas de este grupo bacteriano proporcionan beneficios al huésped cuando se administran en cantidades adecuadas, lo que actualmente se conoce como probióticos.

Los probióticos son de gran interés científico y biotecnológico, debido a las propiedades benéficas a la salud que se han documentado en la literatura científica y tecnológica actual, entre las que destacan la restauración de la microbiota intestinal y vaginal. Adicionalmente, se han reportado otros beneficios de estas cepas como su efecto anticancerígeno, anticolesterol, antidepresivo, antiobesidad, antidiabético, entre otros. Las características funcionales de los probióticos se han asociado con la secreción de moléculas bioactivas; por ejemplo, con algunos péptidos antimicrobianos. El grupo de microorganismos que mayormente se ha reportado como probióticos son las BAL, principalmente las pertenecientes a la familia Lactobacillaceae. En general, la mayoría de los microorganismos probióticos comerciales se han aislado de la microbiota de humanos o de productos lácteos. Sin embargo, el aislamiento y evaluación del potencial probiótico de cepas bacterianas provenientes de productos no lácteos ha cobrado gran interés en la actualidad, debido a que estas cepas podrían tener la ventaja de disminuir el colesterol y de no contener sustancias alergénicas propias de los productos lácteos.

Por otro lado, el pulque es una bebida ancestral mexicana que se ha asociado con la prevención y tratamiento de enfermedades gastrointestinales, lo que actualmente se ha probado que se debe a la presencia de una gran variedad de BAL en la bebida. Debido a esto, diversos estudios en la literatura científica han reportado un alto potencial probiótico de cepas BAL provenientes del pulque y del aguamiel. Sin embargo, en estos estudios aún no se han realizado todas las pruebas *in vitro* requeridas para una evaluación completa del

potencial probiótico de las cepas de estudio; adicionalmente, los estudios completos de actividad probiótica se han realizado principalmente en cepas aisladas del aguamiel. De acuerdo con lo anterior, es de gran interés científico y tecnológico actual, el evaluar el potencial probiótico de cepas BAL aisladas a partir del pulque y caracterizarlas por sus propiedades funcionales como actividad antioxidante, actividad β -galactosidasa y de reducción de colesterol. En este sentido, este trabajo pretende contribuir al estado del arte y de la técnica actual seleccionando cepas con alto potencial probiótico y que además proporcionen beneficios a la salud más allá del de la restauración de la microbiota intestinal. Considerando lo anterior, en el presente trabajo se tiene la premisa de que la caracterización de las cepas BAL aisladas de pulque en función de su perfil probiótico y sus propiedades funcionales, además del estudio de la seguridad de su uso, proporcionará una alternativa para la producción de alimentos probióticos, a los cuáles no sólo se pueda garantizar la seguridad de su uso, sino que también proporcionen diversos beneficios a la salud del consumidor, adicionales a la regulación de la microbiota intestinal.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

Las cepas ácido lácticas del pulque estudiadas en el presente trabajo presentan potencial probiótico y algunas características funcionales de importancia como lo son actividad antioxidante, digestión de lactosa y reducción de colesterol.

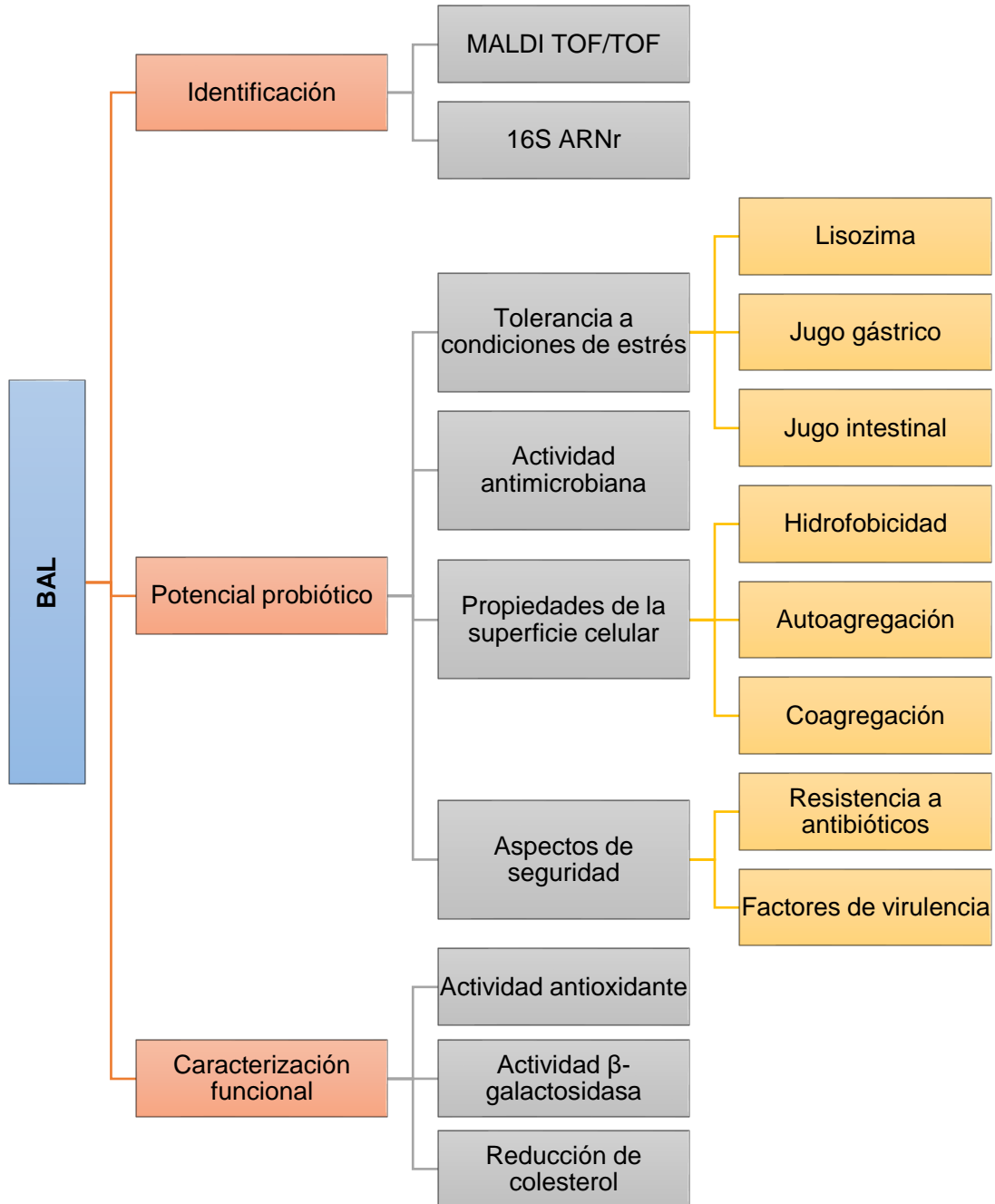
4.2. Objetivo general

Evaluar las cepas BAL de la familia Lactobacillacea aisladas del pulque de acuerdo a su inocuidad, potencial probiótico y funcional, mediante pruebas *in vitro* e *in silico*.

4.3. Objetivos particulares

- Realizar la identificación a nivel especie por técnicas de biología molecular y espectrometría de masas de las cepas BAL del pulque.
- Evaluar el potencial probiótico *in vitro* de las cepas de estudio: resistencia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, seguridad y propiedades de superficie celular.
- Evaluar *in vitro* la actividad antagónica y antimicrobiana de las cepas del pulque contra microorganismos patógenos.
- Evaluar *in vitro* las características funcionales de las cepas de estudio: actividad antioxidante, digestión de lactosa y reducción de colesterol.

5. DIAGRAMA EXPERIMENTAL



6. METODOLOGÍA

6.1. Material biológico y condiciones de cultivo

En este trabajo se estudiaron 7 bacterias ácido lácticas (BAL) previamente aisladas de pulque y evaluadas de acuerdo a su resistencia a condiciones de acidez (pH 2) y sales biliares (0.3% y 0.5%), así como actividad antimicrobiana [20]. La cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* NCFM, cedida amablemente por Danisco USA, se utilizó como control positivo en todas las pruebas realizadas en este trabajo. Todas las BAL fueron reactivadas en medio líquido Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Difco, EE.UU.) y posteriormente sembradas por estriado en agar MRS, después de lo cual se corroboró morfología macroscópica y microscópica.

Los siguientes microorganismos fueron utilizados como controles en las pruebas de seguridad y potencial probiótico: *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) 2348/69, *Salmonella enterica* serovar Typhi ATCC 9992 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 de la Colección de Cultivos de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México; *Pediococcus acidilactici* MXVK133 (GenBank: JQ783346), *Enterococcus faecium* SF68, *Listeria monocytogenes* LM-W207 (GenBank: OQ733281) y *Staphylococcus aureus* SA-W207 (GenBank: OQ733284) de la Colección de Cultivos del Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de Macromoléculas, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, México. Los microorganismos control utilizados para las pruebas de seguridad y potencial probiótico fueron reactivadas en medio líquido soya tripticaseína (TSB, por sus siglas en inglés) y subsecuentemente sembradas por estriado en agar soya tripticaseína (TSA, por sus siglas en inglés).

6.2. Identificación de las bacterias ácido lácticas del pulque

6.2.1. Identificación por el gen 16S ARNr

Para la identificación de las cepas mediante la secuenciación del gen 16S ARNr de las muestras bacterianas se realizó la extracción de ADN con el kit de aislamiento de ADN microbiano Ultra Clean™ (Mo Bio Laboratories Inc., EE. UU.). Para realizar la extracción, se colocó 1.8 mL de cultivo bacteriano de 24 h de crecimiento en un tubo colector de 2 mL. A continuación, se recuperó el pellet celular por centrifugación a 10,000 x g durante 30 s a temperatura ambiente, después de lo cual se adicionó 300 µL de solución Microbead al tubo que contenía el pellet, que a continuación se homogeneizó en vortex. Posteriormente, la

mezcla anterior se transfirió a un tubo Microbead y se adicionó 50 μL de solución MD1. El tubo Microbead se agitó con un vortex por 10 min a velocidad máxima para asegurar una lisis adecuada de las células. Después, el tubo se centrifugó a 10,000 x g durante 30 s a temperatura ambiente.

En seguida de esto, el sobrenadante se transfirió a un tubo colector de 2 mL y se agregó 100 μL de solución MD2, el tubo se agitó en vortex durante 5 s. La mezcla se incubó a 4 °C durante 5 min. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 10,000 x g durante 1 min a temperatura ambiente, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo colector. Se adicionó 900 μL de la solución MD3 al sobrenadante y la mezcla se agitó con el vortex durante 5 s. De la mezcla anterior se tomó 700 μL y se colocaron en el filtro de membrana y el tubo se centrifugó a 10,000 x g durante 30 s a temperatura ambiente. Subsecuentemente, se retiró el sobrenadante y se cargó el resto de la mezcla. El tubo se centrifugó nuevamente y el sobrenadante fue descartado.

Después de esto, se agregó 300 μL de la solución MD4 a la columna y se centrifugó a 10,000 x g durante 30 s a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante del proceso anterior y se realizó una segunda centrifugación para retirar completamente la solución MD4 del filtro de membrana. El filtro de membrana se colocó en un nuevo tubo colector de 2 mL y se agregó 50 μL de solución MD5 en el centro del filtro. El tubo se llevó a centrifugación a 10,000 x g durante 30 s. Finalmente, el filtro fue desechado y se recuperó el ADN. La integridad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 1% y se visualizó en el sistema de documentación de geles Biotop Fluor Shot EVO (BIOTOP, China).

Posteriormente, se amplificó el gen 16S ARNr a partir del ADN obtenido utilizando la solución Taq PCR Master Mix (QIAGEN, Alemania) y los cebadores universales 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT). La mezcla de reacción se preparó como se indica en la Tabla 6. Las condiciones utilizadas para la reacción de PCR fueron las siguientes: desnaturalización (94 °C, 3 min), amplificación (94 °C, 45 s; 52 °C, 30 s; 72 °C, 1 min x 30 ciclos) y una amplificación final a 72 °C durante 10 min.

Tabla 6. Mezcla de reacción para PCR con la solución Taq PCR Master Mix (QIAGEN, Alemania)

Reactivo	Volumen (µL)
Taq PCR Master Mix	25
Primer 27F	5
Primer 1492R	5
H ₂ O libre de RNA	14
Muestra de ADN	1
Total	50

Después del proceso de PCR, los productos de amplificación fueron purificados con el kit de purificación GeneJet PCR (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lituania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los amplificados se mezclaron en vortex 1:1 con la solución *Binding buffer* para su homogenización. Posteriormente, la mezcla se transfirió a una columna de purificación GeneJet, después de lo cual, se centrifugó a 10,000 x g durante 1 min a temperatura ambiente, y a continuación se desechó el sobrenadante. En seguida, se agregó 700 µL del buffer de lavado a la columna y se centrifugó a 10,000 x g durante 1 min a temperatura ambiente, seguido de lo cual, se desechó el sobrenadante. Finalmente, la columna se colocó en un tubo nuevo de 2 mL, al cual se le agregó 50 µL del buffer de elución previamente calentado a 65 °C. La columna se centrifugó a 10,000 x g durante 1 min a temperatura ambiente, después de lo cual se colectó el sobrenadante con el gen 16S ARNr purificado. Los productos purificados se enviaron a secuenciar a los laboratorios de Macrogen Inc. (República de Corea). Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos Refseq del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) utilizando la herramienta de alineación BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

6.2.2. Identificación de aislados bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI Biotyper®

Para la confirmación de la identificación a nivel especie, se utilizó el análisis del perfil proteico o huella digital proteómica mediante espectrometría de masas [168]. Este análisis se realizó en el Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas de la UAM-Iztapalapa.

La extracción de proteínas se realizó mediante la técnica secuencial de extracción con etanol, ácido fórmico y acetonitrilo. Se colocaron colonias bacterianas perfectamente aisladas en 300 µL de agua ultrapura y se mezcló en un agitador tipo vórtex (hasta observar turbidez). Posteriormente, a la mezcla se le adicionó 900 µL de etanol, después de lo cual, se agitó en un agitador tipo vórtex y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. A continuación, los viales se centrifugaron durante 2 min a 14,000 rpm, lo que fue seguido por el retiro del sobrenadante. Al pellet se le añadió ácido fórmico al 70% mezclándolo por pipeteo. A la mezcla anterior, se le añadió acetonitrilo y se centrifugó por 2 min a velocidad máxima. Finalmente, se colocó 1 µL del sobrenadante en una placa de acero (Bruker, Alemania) con 1 µL de la matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, EE. UU.). El análisis se realizó con el espectrómetro de masas MALDI Biotyper® MS Autoflex (Bruker Daltonics, Alemania) utilizando la herramienta MALDI Biotyper®. Los datos resultantes se compararon con la base de datos MBT Compass para asignar los géneros y las especies de las cepas de BAL. Los resultados se expresan en una gama de valores que va de 0 a 3 (Figura 2).

Gama de valores	Descripción	Símbolos	Color
2.00 - 3.00	Identificación de alta confianza	(+++)	verde
1.70 - 1.99	Identificación de baja confianza	(+)	amarillo
0.00 - 1.69	Sin identificación posible	(-)	rojo

Figura 2. Valores de similitud entre las muestras analizadas y la base de datos MBT Compass para la identificación microbiana por espectrometría de masas MALDI Biotyper®.

6.3. Resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas

Con la finalidad de corroborar la capacidad de las BAL de sobrevivir su paso por el tracto gastrointestinal, las cepas estudiadas fueron sometidas *in vitro* a condiciones que simulan el sistema digestivo humano: presencia de lisozima, jugo gástrico (JG), jugo intestinal (JI) y una exposición secuencial a JG y JI (JG/JI). Adicionalmente, en este trabajo se evaluaron la actividad hidrolasa de sales biliares y la actividad antimicrobiana de las cepas de estudio.

6.3.1. Resistencia a lisozima

La resistencia a lisozima (Sigma-Aldrich, PAÍS) se determinó de acuerdo con Torres-Maravilla et al. [19], con algunas modificaciones. De cajas recién sembradas de las cepas ácido lácticas (24 h), se tomó una colonia de inóculo y se sembró en caldo MRS. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 20 h en condiciones de microaerofilia. Posteriormente, se centrifugó 2 mL del cultivo a 4,500 x g durante 6 min a 4 °C, después de lo cual el pellet se sometió a dos lavados con PBS. A continuación, el cultivo se ajustó a una DO₆₀₀ de 1 utilizando solución de Ringer. Por último, se inoculó la cepa al 10% en una solución electrolítica estéril que contenía 10 mg/L de lisozima, tras lo cual la suspensión se incubó a 37 °C durante 3 h. La resistencia de las BAL a la presencia de lisozima se determinó por el método de recuento por extensión en placa por duplicado [20].

6.3.2. Resistencia a jugo gástrico (JG) y jugo intestinal (JI)

La resistencia *in vitro* de las BAL a los JG y JI se realizó tanto por separado como de forma secuencial. Se inocularon colonias frescas de 24 h de las cepas de estudio en 10 mL de caldo MRS y se incubaron a 37 °C durante 20 h en condiciones microaerófilas. Posteriormente, el cultivo bacteriano se centrifugó a 4,500 x g durante 6 min a 4 °C, tras lo cual se recuperó el pellet celular. A continuación, las células se sometieron a dos lavados con PBS y se ajustó su concentración a 10⁸-10⁹ UFC/mL. A continuación, el cultivo celular se inoculó por separado al 10% en jugo gástrico (PBS con 0.3% de pepsina y ajustado a pH 2 con HCl) [169, 170], y en jugo intestinal (PBS con 0.3% de sales biliares, 0.1% de pancreatina y ajustado a pH 8.0 con NaOH) [171]. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 3 h en condiciones de microaerofilia. Por último, en la prueba secuencial, el cultivo proveniente de JG se inoculó al 10% en el JI (JG/JI), después de lo cual se incubó a 37 °C durante 3 h [170]. Como control de la prueba, el cultivo celular se inoculó en PBS a pH 7. La resistencia celular a estas condiciones se determinó por conteo en placa y se expresó como porcentaje logarítmico [20].

6.3.3. Actividad de la enzima hidrolasa de sales biliares (HSB)

La actividad HSB de las cepas de BAL estudiadas se determinó mediante el método de difusión en agar [172]. Discos de papel filtro de 6 mm fueron impregnados con los cultivos bacterianos de estudio y se superpusieron en placas Petri de agar MRS suplementada con

0.5% (p/v) de sales biliares y 0.375 g/L CaCl₂. A continuación, las placas Petri se incubaron en condiciones de microaerofilia a 37 °C durante 48 h. La actividad HSB se evaluó midiendo el diámetro del halo formado alrededor del disco.

6.3.4. Evaluación de actividad antagónica [168]

La evaluación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo en cajas de Petri empleando el medio de crecimiento TSA. La cepa de estudio se inoculó de forma vertical con un hisopo estéril. Después de esto, los microorganismos patógenos o alterantes (microorganismos prueba) cultivados previamente en caldo TSB durante 24 h, se inocularon de forma perpendicular a 2 mm de la cepa de estudio con un hisopo estéril, sin tocar el crecimiento vertical (Figura 3). Las placas Petri se incubaron durante 18 h a 37 °C. Los microorganismos de prueba que mostraron inhibición en su crecimiento se consideraron sensibles a la cepa de estudio.

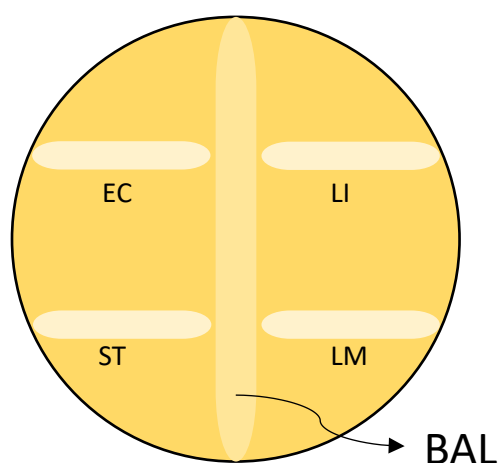


Figura 3. Diagrama del ensayo de actividad antagónica de las BAL del pulque contra microorganismos patógenos. EC, *Escherichia coli*. ST, *Salmonella enterica serovar Typhi*. LI, *Listeria innocua*. LM, *Listeria monocytogenes*.

6.3.5. Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de las cepas ensayadas se evaluó mediante el método de difusión en agar de acuerdo con lo reportado por da Silva et al. [133]. Previo al ensayo, se obtuvieron extractos crudos bacterianos (EC) a partir de cultivos de 20 h de BAL. El cultivo se transfirió a tubos de centrifugación de 15 mL y se llevó a centrifugación a 6,500 x g durante

15 min en condiciones de refrigeración (4 °C). Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se ajustó a pH 7 para eliminar la influencia de los ácidos orgánicos. A continuación, el extracto se filtró a través de membranas estériles de 0.22 µm de tamaño de poro y se almacenó a -80 °C. Para la prueba de difusión en agar, se superpusieron discos de papel filtro de 6 mm impregnados con EC sobre placas de TSA previamente inoculadas con 140 µL de suspensión de *L. monocytogenes* LM-W207 (10⁶-10⁷ UFC/mL). Como controles positivos se utilizó nisina y lisozima al 10% de concentración. La actividad antibacteriana se evaluó midiendo el diámetro de la zona de inhibición formada alrededor del disco después de incubar la placa a 37 °C durante 24 h.

6.4. Propiedades de superficie celular

Las características de superficie celular evaluadas en este trabajo fueron la hidrofobicidad, la autoagregación, y la coagregación, debido a que estas propiedades se han asociado con la capacidad de las bacterias para adherirse al epitelio intestinal [17, 130].

6.4.1. Hidrofobicidad

El ensayo de hidrofobicidad se realizó por el método de adhesión microbiana a solventes (MATS, por sus siglas en inglés) [17, 131]. Los cultivos de BAL en fase exponencial se sedimentaron mediante centrifugación a 5,000 x g durante 30 min, lo que fue seguido por dos lavados con PBS (pH 7.2), después de lo cual el pellet se resuspendió en el mismo buffer a una DO₆₀₀ 1. A continuación, la suspensión se mezcló por separado con diferentes disolventes orgánicos (cloroformo y hexano) en una proporción 1:1, seguido de agitación en vortex durante 30 s. Posteriormente, la mezcla se incubó por 1 h a temperatura ambiente, tras lo cual se midió la absorbancia de la fase acuosa a 600 nm. La hidrofobicidad se calculó con la siguiente ecuación:

$$H[\%] = \left(\frac{A_0 - A}{A_0} \right) * 100,$$

donde A₀ y A, corresponden con la absorbancia antes y después de la extracción con disolventes orgánicos, respectivamente.

6.4.2. Autoagregación

La capacidad de autoagregación de las BAL se evaluó utilizando el método propuesto por Śliżewska et al. [130], con algunas modificaciones. Se partió de las cepas BAL en su fase exponencial. Posteriormente, el cultivo celular se centrifugó a 5,000 x g durante 10 min a 4 °C, y a continuación se recuperó el sedimento celular. Subsecuentemente, las células se lavaron dos veces con PBS pH 7.2, después de lo cual el pellet se resuspendió en PBS hasta una DO₆₀₀ de 0.5. Después de esto, la suspensión se dejó reposar 10 min y enseguida se incubó a 25 °C. A continuación, se leyó la DO₆₀₀ de la suspensión celular a diferentes tiempos: 0, 2, 4, 6, 20 y 24 h, para estimar el porcentaje de autoagregación (A) haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$A[\%] = \left(\frac{A_0 - A}{A_0} \right) * 100;$$

donde A₀ es la absorbancia inicial y A la absorbancia a los diferentes tiempos.

6.4.3. Coagregación

Se prepararon suspensiones bacterianas de las BAL y los patógenos (*L. monocytogenes* LM-W207, *Salmonella enterica* serovar Typhi ATCC 9992 y EPEC) como se describió en el ensayo de autoagregación [130]. Posteriormente, las BAL se mezclaron por separado con los patógenos en volúmenes iguales y se incubaron a 25 °C [134]. La coagregación se monitoreó leyendo la DO₆₀₀ a diferentes tiempos: 2, 4, 6, 20 y 24 h. A continuación. Se calculó el grado de coagregación con la siguiente ecuación:

$$C[\%] = \frac{[(A_x + A_{BAL}) - (A_{mix})]}{[(A_x + A_{BAL})]} * 100;$$

donde A_x es la absorbancia inicial de *L. monocytogenes* LM-W207, *S. enterica* serovar Typhi ATCC 9992 o EPEC; A_{BAL} es la absorbancia inicial de la cepa BAL; y A_{mix} es la absorbancia de la mezcla a los diferentes tiempos del ensayo.

6.5. Aspectos de seguridad de las BAL

Los aspectos de seguridad de las cepas BAL de estudio que se evaluaron en este trabajo incluyeron la resistencia a antibióticos comunes por difusión en disco y expresión de

genes relacionados a resistencia, actividad hemolítica y el estudio de la expresión de genes asociados a factores de virulencia.

6.5.1. Resistencia a antibióticos

6.5.1.1. Método de difusión en agar

La resistencia a antibióticos de las cepas de estudio por el método de difusión en agar se realizó utilizando el antibiograma bacteriano Combi Disc Multidiscos para Gram Positivos GP1 (Accutrack, Ciudad de México, México) y con vancomicina (30 µg) (PiSA, Ciudad de México, México) [173, 174]. Para este análisis se tomaron colonias de las BAL de estudio de una caja petri con medio MRS con 36 h de crecimiento y se transfirieron a un tubo que contenía de 4 a 5 mL de suero fisiológico, tras lo cual el cultivo se incubó a 37 °C hasta alcanzar una turbidez comparable al estándar de 0.5 de McFarland. Después de esto, se sumergió en la suspensión un hisopo estéril, el cual se extendió por toda la superficie de una caja petri con agar Muller Hinton. Las cajas se dejaron secar durante 3-5 min, tras lo cual los discos con antibióticos (6 mm) se colocaron sobre la superficie del agar. Posteriormente, las placas se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. Pasado el tiempo de incubación, se midió la zona de inhibición. Los resultados se reportaron como sensibles (≥ 30 mm), intermedios (16-29 mm) o resistentes (≤ 15 mm), de acuerdo con la zona de inhibición obtenida [174]. En el estudio se utilizó la cepa EPEC como ensayo control.

6.5.1.2. Ensayo por PCR

La resistencia a antibióticos también se determinó por PCR, mediante la amplificación de genes asociado a resistencia de las cepas BAL de prueba del pulque y el control probiótico (*Lact. acidophilus* NCFM) [13, 175]. La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el kit de aislamiento de ADN microbiano Ultra Clean™ (Mo Bio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, EE. UU.) como se describió en la Sección 6.2.1. Las reacciones de PCR se realizaron con la polimerasa Phusion™ High-Fidelity DNA (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lithuania) y los primers utilizados se presentan en la Tabla 7. La mezcla de reacción se preparó como se indica en la Tabla 8. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Mastercycler EP Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) programado para cada gen con las siguientes condiciones: *vanA* (95 °C, 7 min; 35 x [95 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 2 min]; 72 °C, 10 min); *mecA* (95 °C, 7 min; 35 x [95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 2 min]; 72 °C, 10 min); *tetM* (94 °C, 5 min; 35 x [94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 2 min]; 72 °C, 10 min); y *tetS* (94 °C, 5 min; 35 x [94 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 72 °C, 2 min]; 72 °C, 10 min). Como controles positivos se utilizaron las siguientes cepas: *Pediococcus acidilactici*

MXVK133 (*vanA*), *Staphylococcus aureus* SA-W207 (*mecA*, *tetM* y *tetS*), *Listeria monocytogenes* LM-W207 (*mecA*), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (*tetM*) y EPEC (*mecA*). Los productos de las reacciones de PCR se verificaron en un gel de agarosa al 1.5% utilizando un marcador de ADN de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.).

Tabla 7. Cebadores utilizados para la detección de resistencia a antibióticos y factores de virulencia [13, 175].

Gen	Descripción	Primer (sequence 5'-3')	Tamaño del producto (pb)
<i>mecA</i>	Penicilina	CTTTGCTAGAGTAGCACTCG GCTAGCCATTCCTTTATCTTG	500
<i>tetM</i>	Tetraciclina (factor M)	ACAGAAAGCTTATTATATAAC TGGCGTGTCTATGATGTTTAC	171
<i>tetS</i>	Tetraciclina (factor S)	GAAAGCTTACTATACAGTAGC AGGAGTATCTACAATATTTAC	169
<i>vanA</i>	Vancomicina type A	GGCTGCGATATTCAAAGCTC CCGGCTTAACAAAAACAGGA	157
<i>cyIM</i>	Modificación postraduccional de la citolisina	CTGATGGAAAGAAGATAGTAT TGAGTTGGTCTGATTACATTT	742
<i>Esp</i>	Proteína de superficie enterocócica	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	933
<i>Cpd</i>	Feromona cPD1 lipoproteína	TGGTGGGTTATTTTTCAATTC TACGGCTCTGGCTTACTA	782
<i>Ace</i>	Adhesina de colágeno	AAAGTAGAATTAGATCCACAC TCTATCACATTCGGTTGCG	350
<i>gelE</i>	Gelatinasa	ACCCCGTATCATTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	419
<i>cyIA</i>	Activación de la citolisina	TGGATGATAGTGATAGGAAGT TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	517
<i>Ccf</i>	Lipoproteína precursora de la feromona cCF10	GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG AGCCGCTAAAATCGGTAAAAT	543
<i>Agg</i>	Pared celular de unión al colágeno	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC AAACGGCAAGACAAGTAAATA	1553
<i>efaA_{fs}</i>	Adhesión específica de <i>Enterococcus faecalis</i> a la pared celular	GACAGACCCTCACGAATA AGTTCATCATGCTGTAGTA	705
<i>efaA_{fm}</i>	Adhesión específica de <i>Enterococcus faecium</i> a la pared celular	AACAGATCCGCATGAATA CATTTTCATCATCTGATAGTA	735

6.5.2. Detección de factores de virulencia

Para determinar la presencia de genes asociados a factores de virulencia en las cepas de estudio y el control probiótico, también se realizaron experimentos de PCR [13]. Las reacciones se realizaron con la enzima polimerasa Phusion™ High-Fidelity DNA (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lithuania) y los primers utilizados se presentan en la Tabla 7. Las mezclas de reacción se prepararon como se indica en la Tabla 8. Las reacciones se realizaron en un termociclador Mastercycler EP Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) programado con las siguientes condiciones: 94 °C, 2 min; 30 x [94 °C, 1 min; 54 °C, 1 min; 72 °C, 1 min]; 72 °C, 5 min. Se utilizaron las siguientes cepas como controles positivos: EPEC (*efaAfs*), *Enterococcus faecium* MXVK29 (*efaAfm*) y *Enterococcus faecalis* MXVK133 para el resto de los genes. Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa al 1% utilizando el marcador de ADN de 1 kb (Thermo Fisher Scientific Baltics).

Tabla 8. Mezcla de reacción para PCR con la enzima polimeasa Phusion™ High-Fidelity DNA (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lithuania).

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer 5x HF	10
MgCl ₂ 50 µM	2
dNTP's	1
Polimeasa Phusion™ High-Fidelity DNA	1
Primer F (10 µM)	5
Primer R (10 µM)	5
H ₂ O libre de RNA	14
ADN (0.5 µg/µL)	1
Total	50

6.5.3. Actividad hemolítica

La actividad hemolítica se realizó de acuerdo con el método reportado por Castro-Rodríguez et al. [17]. Para este ensayo se tomó una colonia a partir de cultivos frescos (24 h) provenientes de medio agar MRS se tomó una colonia y se inoculó por estriado en medio agar Columbia adicionado con sangre desfibrilada al 5%. Las cajas Petri se incubaron a 37 °C durante 24 h. La aparición y el color de los halos son indicativo del tipo de actividad

hemolítica: i) transparente, actividad β -hemolítica; ii) verde, α -hemolítica; iii) sin halo, γ -hemolítica [7, 176]. Para esta prueba, la cepa *L. monocytogenes* LM-W207 se utilizó como control positivo.

6.6. Caracterización funcional

La evaluación del potencial funcional de las BAL de estudio se llevó a cabo determinando *in vitro* las actividades antioxidante y β -galactosidasa, así como la capacidad para reducir el colesterol. Estas características funcionales son las más ampliamente reportadas en la literatura para cepas probióticas.

6.6.1. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó de acuerdo con lo reportado por Rezaei et al. [177] y Kaur et al. [178], con algunas modificaciones. Se inocularon colonias de las BAL de estudio con 36 h de crecimiento en caldo MRS, las cuales se incubaron durante 20 h a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 6,000 x *g* durante 10 min a 4 °C, después de lo cual se recuperó el sedimento celular. Posteriormente, las células se lavaron con agua y se resuspendieron en agua bidestilada estéril. La suspensión celular se ajustó a 10¹⁰ UFC/mL de acuerdo con el estándar de McFarland. A continuación, la suspensión celular se mezcló 1:1 con una solución etanólica de DPPH al 0.004% (p/v). La mezcla se agitó vigorosamente en un agitador tipo vórtex y subsecuentemente se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min. Como blanco de la prueba, se preparó la mezcla de reacción anterior utilizando agua bidestilada estéril en lugar de la suspensión celular. Finalmente, las mezclas de reacción se centrifugaron a 8,000 x *g* durante 10 min y la absorbancia del sobrenadante se leyó a 517 nm. El porcentaje de actividad antioxidante (AA) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%AA = 100 * \left[1 - \left(\frac{A_m}{A_b} \right) \right];$$

donde A_b es la absorbancia del blanco y A_m la absorbancia de la muestra.

6.6.2. Actividad β -galactosidasa

La prueba de actividad β -galactosidasa se realizó de acuerdo con lo reportado por Kaur et al. [178] y Gheyanchi et al. [179], con algunas modificaciones. Se tomó una colonia a partir

de cultivos frescos de 36 h provenientes de agar MRS, y ésta se inoculó por estriado en medio agar de lactosa (0.5% de lactosa, 0.5% de peptona, 0.3% de extracto de carne y 1.5% de agar bacteriológico) adicionado con 50 µg/mL del compuesto cromogénico 5-bromo-4-choro-3-idolyl-β-galactopyranoside (X-gal; Sigma-Aldrich). Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24-48 h. La presencia de colonias teñidas de azul fue considerada como un indicativo de actividad β-galactosidasa.

6.6.3. Reducción del colesterol

El ensayo de reducción de colesterol se realizó de acuerdo con lo reportado por Das et al. [180], con ligeras modificaciones. Las cepas BAL de estudio se cultivaron en caldo MRS y se incubaron a 37 °C durante 20 h. Adicionalmente, se preparó caldo MRS adicionado con 0.5% de sales biliares y 100 µg/mL de colesterol previamente disuelto en etanol. Las bacterias de estudio se inocularon al 1% en el caldo MRS-colesterol, seguido de lo cual, el cultivo se incubó durante 24 h a 37 °C. Como blanco se utilizó caldo MRS-colesterol añadido al 1% con caldo MRS sin inocular. Posteriormente, las suspensiones se centrifugaron a 3,000 x g durante 10 min. Finalmente, los sobrenadantes se recuperaron y se leyó la absorbancia a 570 nm. El porcentaje de reducción del colesterol (RC) se calculó con la siguiente ecuación:

$$RC [\%] = \frac{A_b - A_{BAL}}{A_b} \times 100;$$

donde A_b y A_{BAL} corresponden a la absorbancia del blanco y de la suspensión con las bacterias BAL, respectivamente.

6.7. Análisis estadístico y multivariable

Se realizaron análisis ANOVA de una vía con un nivel de significancia del 95% para evaluar si existía diferencias significativas entre las distintas condiciones evaluadas. Además, para el análisis de comparación de medias, se realizaron pruebas de Tukey considerando un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$). Se utilizó el software Minitab 17 (Minitab Inc., EE.UU.) para los análisis anteriores. Adicionalmente, se realizaron análisis de componentes principales (ACP), mapa de calor y gráficos de dispersión para visualizar y estudiar la

agrupación de datos multivariantes en RStudio v.1.4.1106, utilizando las funciones plot, biplot, heatmap, respectivamente.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Identificación de BAL

Considerando que en este trabajo uno de los objetivos principales es evaluar el potencial probiótico de un número de aislados bacterianos obtenidos a partir del pulque, resulta importante caracterizar genóticamente dichos aislados, si es posible a nivel de género y especie. La identificación de las BAL de estudio se realizó por secuenciación del gen 16S ARNr, la cual se corroboró por espectrometría de masas MALDI Biotyper®. A partir de la secuenciación del gen 16S ARNr, se determinó que las cepas de estudio pertenecen a la familia Lactobacillaceae presentando porcentajes de homología con secuencias de microorganismos depositadas en la base de datos GenBank del NCBI que van del 97 al 99%. Las BAL del pulque de este estudio fueron identificadas como pertenecientes a las siguientes especies: *Lacticaseibacillus paracasei*, *Levilactobacillus brevis*, y *Lactiplantibacillus plantarum* (Tabla 9). Asimismo, en la Figura 4 se muestra el árbol filogenético que se construyó a partir de las secuencias obtenidas.

Los resultados de identificación fueron corroborados por espectrometría de masas MALDI Biotyper® (Tabla 9). Los resultados obtenidos con espectrometría de masas coinciden con lo obtenido por la secuenciación del gen 16S ARNr, en los que las puntuaciones de identificación resultaron en un rango entre 2.10 a 2.45, lo cual indica que se trata de identificaciones de alta confianza. Diversos estudios realizados sobre la microbiota del pulque han reportado una presencia significativa de las especies de la familia Lactobacillaceae reportadas en el presente trabajo [15, 181].

Tabla 9. Resultados de la identificación de las cepas de bacterias lácticas del pulque mediante secuenciación del gen 16S ARNr y espectrometría de masas MALDI Biotyper.

Cepa	Taxón	Número de acceso	BLAST NCBI	MALDI Biotyper® MS
			% identidad	Valores
RVG1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	MN480472.1	97.02	2.20
RVG2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MN480473.1	99.05	2.26
RVG4	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MN480475.1	97.9	2.47
UTMB1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MW772233	98.64	2.44
UTMB2	<i>Levilactobacillus brevis</i>	MW772234	98.84	2.29
UTMB4	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	MW772235	98.43	2.46
UTMB7	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	MW772236	99.72	2.46

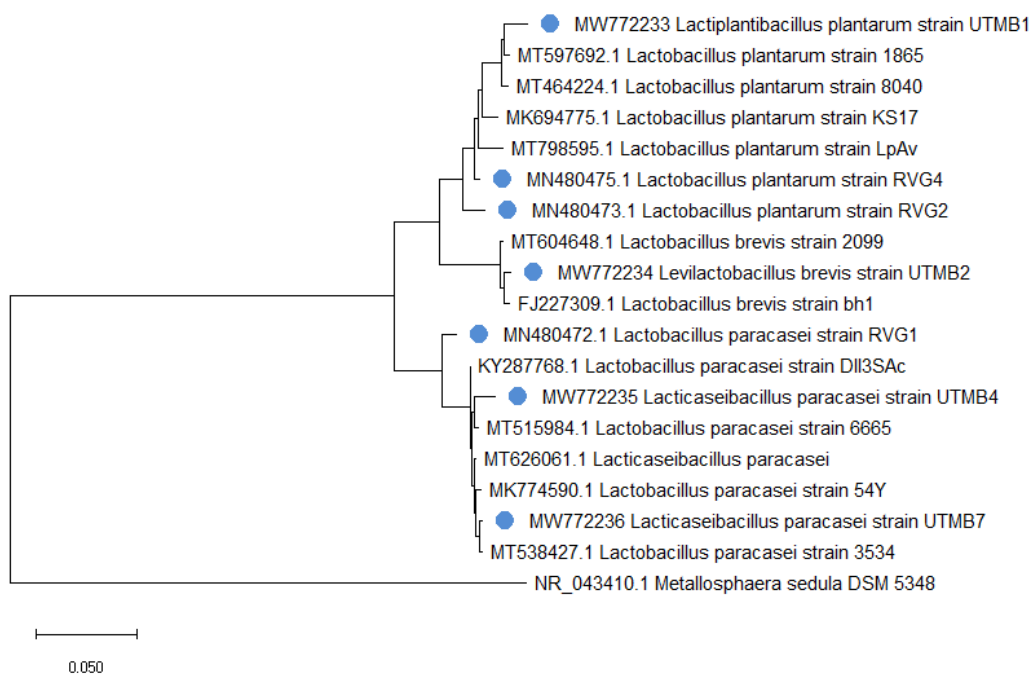


Figura 4. Árbol filogenético de las secuencias identificadas de BAL del pulque y secuencias de referencia obtenidas de la base de datos GenBank. Las BAL del pulque están marcadas con un círculo azul y cada una tiene sus propios números de acceso. *Metallosphaera sedula* ARS120-2 se utilizó como cepa de referencia de grupo externo.

Además, varias especies de bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecientes a la familia Lactobacillaceae se han empleado comercialmente como cepas probióticas con diversos beneficios confirmados para la salud, lo que confiere a este grupo bacteriano un gran protagonismo en las industrias alimentaria y farmacéutica [177]. Sin embargo, es importante destacar que los efectos biológicos de los probióticos son específicos de cada cepa y que el éxito o el fracaso de una cepa no se puede extrapolar a otra cepa. Por lo tanto, es imperativa la identificación adecuada de las cepas utilizando las diversas tecnologías disponibles. La identificación de especies se puede realizar mediante análisis de secuencia del gen 16S ARNr y espectrometría de masas. La identificación de cepas se puede realizar además mediante varios métodos moleculares reproducibles o utilizando rasgos fenotípicos únicos [182].

7.2. Resistencia a condiciones gastrointestinales

7.2.1. Condiciones simuladas del tracto gastrointestinal

La principal característica de los microorganismos probióticos la constituye su capacidad para resistir condiciones adversas en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, en este trabajo se abordó con mayor detalle la caracterización probiótica de las BAL de estudio. Las cepas de estudio fueron sometidas a las siguientes condiciones de estrés que simulan el tracto gastrointestinal: i) presencia de lisozima; ii) jugo gástrico; iii) jugo intestinal; y iv) tratamientos combinados de jugo gástrico y jugo intestinal. Uno de los primeros contactos de las bacterias probióticas con el sistema digestivo humano se da en la boca a través de la saliva; en este fluido se encuentran varias enzimas como la lisozima, misma que podría tener un efecto lítico sobre estas bacterias. De acuerdo a esto, en este trabajo se evaluó la capacidad de resistencia de las cepas ácido lácticas a 10 mg/L de lisozima.

Después de exponer las BAL de estudio a lisozima, las cepas presentaron porcentajes de supervivencia entre el 51 y el 91% (Tabla 10), que fueron en todos los casos superiores al de la cepa control *Lact. acidophilus* NCFM (47.5%). En particular, las cepas *Lact. paracasei* RVG1 y *Lact. plantarum* RVG2 presentaron un porcentaje de resistencia del 91% a la lisozima, valor significativamente mayor al del resto de las cepas. Torres-Maravilla et al. [19] evaluaron la resistencia a lisozima (10 mg/L) de 14 cepas BAL aisladas de pulque. Los autores reportaron porcentajes de supervivencia a esta condición de estrés que van del 76 al 99.9%. En dicho estudio, las cepas *Lact. plantarum* LBH1062 (99.7%) y *Lact. brevis* LBH1069 (99.9%) mostraron los mayores porcentajes de supervivencia en presencia de

lisozima. En el presente estudio, también se observó una mayor resistencia a lisozima por parte de una cepa de *Lact. plantarum*. En general, los resultados de los investigadores son comparables con los del presente trabajo.

Adicionalmente, en el ambiente abdominal se encuentran algunas de las condiciones más agresivas del proceso de digestión de los alimentos, como son pH ácido y presencia de enzimas como la pepsina. En este sentido, se conoce que el paso por el estómago puede tardar aproximadamente hasta 3 h [169]. Por lo tanto, resulta importante garantizar la sobrevivencia de las bacterias probióticas en esas condiciones y asegurar que éstas no sean inactivadas. En este trabajo se evaluó la resistencia de las BAL de estudio a jugo gástrico (JG) compuesto por PBS con 0.3% de pepsina y ajustado a pH 2 con HCl. Las cepas estudiadas presentaron porcentajes de supervivencia al jugo gástrico que osciló entre el 26 y el 49.3%, mientras que la cepa probiótica comercial *Lact. acidophilus* NCFM tuvo una supervivencia del 56% (Tabla 10).

Las BAL del pulque presentaron porcentajes de supervivencia a JG significativamente inferiores ($p < 0.05$) en comparación con la cepa probiótica comercial *Lact. acidophilus* NCFM, siendo las cepas *Lact. plantarum* RVG2 y *Lact. paracasei* UTMB7 las que presentaron los mayores porcentajes de supervivencia: 48 y 49%, respectivamente. Previamente, Ruiz-Ramírez et al. [20] evaluamos la resistencia de estas cepas a pH 2.0, obteniendo porcentajes de supervivencia entre el 61 al 81%. De acuerdo a esto, los resultados de este estudio indican que además del bajo pH, la enzima proteolítica tuvo una contribución sustancial en la reducción del porcentaje de supervivencia de las cepas, por lo que se considera importante considerar la combinación de ambas condiciones para la evaluación adecuada de cepas probióticas candidatas. Sin embargo, incluso si una cepa no fuera resistente a los jugos gástricos, pero tuviera características interesantes, es posible utilizar tecnologías como la microencapsulación bacteriana como medio para proteger a los microorganismos probióticos de factores ambientales adversos, como las condiciones del jugo gástrico [183].

Por otra parte, en el intestino se tiene la presencia de sales biliares y enzimas como la pancreatina. Los alimentos pueden durar entre 3 y 8 h en el intestino. Por lo cual, los fármacos son sometidos a más condiciones adversas. Considerando lo anterior, en este estudio se evaluó *in vitro* la resistencia de las bacterias de prueba a jugo intestinal (JI), obteniendo porcentajes de supervivencia de entre el 91 y el 99%, que fueron comparables

al resultado obtenido con la cepa probiótica *Lact. acidophilus* NCFM (93.9%) (Tabla 10). En general, las BAL de estudio mostraron una alta resistencia a JI. Las cepas *Lact. paracasei* RVG4 (99.4%), *Lact. brevis* UTMB2 (99.5%) y *Lact. paracasei* UTMB7 (99.9%) mostraron los mayores porcentajes de resistencia al jugo intestinal. Por otra parte, sólo la cepa *Lact. plantarum* RVG2 presentó un menor porcentaje de resistencia a JI en comparación con la cepa probiótica comercial *Lact. acidophilus* NCFM (93.9%).

Adicionalmente, se realizó una prueba secuencial que simula *in vitro* el paso del probiótico por el estómago y el intestino (JG/JI). En esta prueba (JG/JI), las cepas de estudio presentaron porcentajes de supervivencia entre el 25 y el 44%, mientras que la cepa probiótica *Lact. acidophilus* NCFM tuvo un porcentaje de supervivencia del 40% (Tabla 10). Con esta simulación se pudo corroborar que la condición más estresante para las BAL de estudio fue el jugo gástrico, considerando que la mayoría de las cepas mantuvieron el porcentaje de supervivencia que tenían después de pasar por las condiciones simuladas del estómago (JG).

Zhang et al. [170] evaluaron cepas BAL con potencial probiótico aisladas de leche cruda local Holstein. En este estudio los autores evaluaron condiciones simuladas del tracto gastrointestinal similares a las evaluadas en el presente trabajo. Los investigadores reportaron el aislamiento de 14 de cepas ácido lácticas que de manera general presentaron un alto porcentaje de sobrevivencia al jugo gástrico (74-99%). Los resultados de sobrevivencia celular reportados en ese estudio fueron superiores a los obtenidos en este trabajo; sin embargo, esto se puede deber a que los autores evaluaron la condición de jugo gástrico con un pH menos ácido (pH 3) al que se evaluó en las cepas del pulque (pH 2) en este trabajo. Por otra parte, en la prueba secuencial de paso por el estómago y el intestino, los autores reportaron una disminución considerable del porcentaje de supervivencia en todas las cepas (64 - 84%): incluso una de las cepas (*Lactococcus lactis* L2) disminuyó en un 50% en el proceso combinado, pasando del 88 al 33% de resistencia celular. Estos resultados indican que, a diferencia de nuestro estudio, las cepas probadas por los investigadores presentaron una mayor sensibilidad al jugo intestinal. Estos resultados corroboran la importancia de la simulación secuencial del paso por el estómago y el intestino. Los porcentajes de supervivencia obtenidos con las BAL del pulque en el presente trabajo son comparables con lo reportado por estos autores.

7.2.2. Actividad hidrolasa de sales biliares

Uno de los principales mecanismos relacionados con la resistencia a las sales biliares por parte de los microorganismos ácido lácticos es la producción de enzimas hidrolasas de sales biliares (HSB) [184]. Por lo anterior, se evaluó la actividad HSB de las BAL de estudio y el control probiótico. Todas las cepas ensayadas presentaron actividad HSB, incluyendo el control, resultando en zonas de actividad entre 15.5 y 28.7 mm (Tabla 10). Como resultado de la prueba, se observó una mayor lisis de sales biliares con las cepas *Lactiplantibacillus plantarum* RVG2, *Lactiplantibacillus plantarum* RVG4, *Lactiplantibacillus plantarum* UTMB1 y *Levilactobacillus brevis* UTMB2, resultados que fueron comparables al obtenido con la cepa probiótica comercial *Lact. acidophilus* NCFM. De manera similar, Vijayalakshmi et al. [1] evaluaron la actividad HSB de 9 cepas BAL utilizando un medio con 0.3% de sales biliares, reportando que las cepas *Lact. rhamnosus*, *Lact. plantarum* y *Lact. casei* presentaron actividad HSB.

La actividad HSB puede facilitar el paso y colonización de las BAL en el tracto gastrointestinal del huésped. Adicionalmente, la desconjugación de las sales biliares conjugadas resulta en la producción de glicina y taurina, aminoácidos que desempeñan un papel nutricional en el organismo y que pueden ser un medio utilizado para algunos probióticos para obtener carbono, nitrógeno y azufre. Recientemente se ha reportado que la HSB y los ácidos biliares libres participan en diversos procesos metabólicos, como la regulación de la absorción de lípidos en la dieta, el metabolismo del colesterol y la homeostasis energética y de la inflamación [185].

Tabla 10. Caracterización *in vitro* del potencial probiótico de las bacterias lácticas del pulque. Resistencia a las barreras del tracto gastrointestinal: Jugo gástrico (JG), jugo intestinal (JI), tratamiento secuencial JG/JI y presencia de lisozima; actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes*; y actividad hidrolasa de sales biliares (HSB) (0.5% BS).

Cepa	Porcentaje logarítmico de sobrevivencia (3 h)				Actividad antimicrobiana (<i>L. monocytogenes</i> , mm) ^a	Actividad HSB (0.5% BS, mm)
	JG	JI	JG/JI	Lisozima		
<i>Lact. paracasei</i> RVG1	26.9 ± 0.1 ^e	94.12 ± 0.5 ^d	25.0 ± 1.2 ^f	91.0 ± 1.4 ^a	9.8 ± 0.8 ^{a, b, c}	15.5 ± 1.3 ^d
<i>Lact. plantarum</i> RVG2	48.4 ± 0.2 ^b	91.1 ± 0.0 ^e	39.0 ± 0.2 ^{b, c}	90.9 ± 0.1 ^a	9.7 ± 0.6 ^{b, c}	20.7 ± 2.1 ^{b, c}
<i>Lact. plantarum</i> RVG4	43.4 ± 0.6 ^c	99.4 ± 0.3 ^{a, b}	44.2 ± 0.4 ^a	83.4 ± 0.5 ^c	7.5 ± 0.5 ^d	21.1 ± 1.0 ^{b, c}
<i>Lact. plantarum</i> UTMB1	36.8 ± 0.6 ^d	98.8 ± 0.0 ^b	29.1 ± 0.3 ^e	88.1 ± 0.8 ^b	9.2 ± 0.8 ^{b, c, d}	22.0 ± 1.0 ^b
<i>Lact. brevis</i> UTMB2	36.7 ± 0.2 ^d	99.5 ± 0.4 ^{a, b}	31.2 ± 0.0 ^d	73.9 ± 0.4 ^e	9.5 ± 0.5 ^{b, c}	27.7 ± 1.2 ^a
<i>Lact. paracasei</i> UTMB4	26.1 ± 0.2 ^e	97.3 ± 0.1 ^c	30.1 ± 0.4 ^{d, e}	82.5 ± 0.2 ^c	8.2 ± 0.3 ^{c, d}	18.7 ± 0.6 ^{c, d}
<i>Lact. paracasei</i> UTMB7	49.3 ± 0.1 ^b	99.9 ± 0.0 ^a	38.2 ± 0.2 ^c	65.8 ± 0.6 ^f	10.0 ± 1.0 ^{a, b}	17.0 ± 1.0 ^d
LA ²	56.1 ± 0.3 ^a	93.9 ± 0.2 ^d	40.3 ± 1.1 ^b	47.5 ± 0.4 ^g	11.5 ± 0.5 ^{a, c}	28.7 ± 0.6 ^a

Los resultados se expresan como la media ± DE (n = 2).

Las letras corresponden a los resultados de la prueba de Tukey (p < 0.05); letras distintas en cada columna indican diferencias significativas en la prueba de Tukey.

¹Lisozima 12.0 ± 1.0 mm; nisina 18.3 ± 1.5 mm.

²LA, cepa probiótica de control *Lactobacillus acidophilus* NCFM.

7.2.3. Actividad antagónica

Una de las características más importantes de los microorganismos probióticos es su actividad antagónica contra microorganismos competidores, la cual se atribuye principalmente a que estos microorganismos pueden adherirse eficazmente a la mucosa intestinal. Otro mecanismo que le confiere actividad antagónica a los microorganismos probióticos es la producción de diversos metabolitos con actividad bactericida o bacteriostática.

Como resultado de la prueba, las BAL de estudio mostraron actividad antagónica contra los 4 microorganismos patógenos estudiados, los cuales son considerados nocivos e incluso mortales para las personas. De entre las cepas estudiadas, destacó la actividad de las cepas identificadas como *Lacticaseibacillus paracasei*, por observarse mayor antagonismo contra los cuatro patógenos (Figura 5).



Figura 5. Actividad antagónica de la cepa UTMB4 (*Lacticaseibacillus paracasei*) en TSA contra microorganismos patógenos: EC, *Escherichia coli*. ST, *Salmonella enterica serovar Typhi*. LI, *Listeria innocua*. LM, *Listeria monocytogenes*.

7.2.4. Actividad antibacteriana

En el tracto gastrointestinal, las cepas BAL se enfrentan a un nicho competitivo por sitios de unión en el epitelio intestinal, por lo que su capacidad antibacteriana proporciona un medio eficaz de colonización epitelial [133]. La actividad antibacteriana que presentan las BAL puede deberse a la producción de diversos compuestos como los ácidos, peróxido de hidrogeno, diacetilo, péptidos antimicrobianos y enzimas como la peptidoglucano hidrolasa (PGH). Actualmente, los compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica han cobrado gran relevancia por su importancia científica y comercial, particularmente las bacteriocinas y las PGH [20].

En este trabajo, se probó la actividad antibacteriana de las cepas de estudio mediante el uso de los sobrenadantes de las cepas libres de células neutralizados e incubados en microaerofilia para descartar la actividad por compuestos diferentes a los de naturaleza proteica. Las cepas de estudio presentaron zonas de inhibición un rango entre 6.9 y 9.1 mm (Tabla 10). La cepa *Lactocaseibacillus paracasei* UTMB7 presentó la mayor zona de inhibición (9.1 mm) entre las cepas de estudio, correspondiendo estadísticamente al mismo nivel de actividad antibacteriana que el control *Lact. acidophilus* NCFM (8.8 mm). Las actividades antibacterianas de los controles positivos lisozima y nisina fueron de 13.4 mm y 11.3 mm, respectivamente.

Castro-Rodríguez et al. [17] evaluaron 4 cepas ácido lácticas provenientes del aguamiel, identificando todas las cepas como *L. mesenteroides* (SD1, SD23, SF2 y SF3). Los autores evaluaron la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células de las 4 cepas. Una de las cepas patógenas objetivo fue *L. monocytogenes* y como control positivo utilizaron la cepa probiótica *Lact. plantarum* 299v. Los investigadores reportaron que las 4 cepas presentaron actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* con diámetros de inhibición de entre 9 y 13 mm. La actividad antimicrobiana de las BAL probadas en el presente trabajo contra *L. monocytogenes* LM-W207 es comparable con las reportadas en dicho estudio.

7.3. Propiedades de la superficie celular

7.3.1. Hidrofobicidad

La hidrofobicidad se ha considerado un criterio importante para seleccionar una cepa probiótica porque este atributo está relacionado con la capacidad de autoagregación de las

bacterias LAB, que a su vez puede estar asociada con la habilidad de los microorganismos para adherirse al epitelio intestinal [131, 1]. La hidrofobicidad se evaluó utilizando dos solventes orgánicos: cloroformo (Cl) y hexano (Hex) (Tabla 11), con porcentajes de hidrofobicidad comprendidos entre 16 y 91%, y entre 3 y 53%, respectivamente. *Levilactobacillus brevis* UTMB2 fue la cepa que presentó las mayores hidrofobicidades entre las bacterias ensayadas (Cl: 91.5%, Hex: 53.0%), con valores comparables a los presentados por la cepa control *Lact. acidophilus* NCFM (Cl: 95.7%, Hex: 55.2%), pero estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). Las cepas de estudio presentaron valores de adhesión más altos en comparación con otros estudios realizados en bacterias aisladas del pulque [19].

Torres-Maravilla et al. [19] estudiaron bacterias ácido lácticas aisladas del pulque considerando su potencial probiótico y su actividad antiinflamatoria. En este estudio los investigadores evaluaron la hidrofobicidad de las BAL en presencia de hexano, que es uno de los solventes que se evaluaron en el presente trabajo. Los autores reportaron porcentajes de hidrofobicidad entre el 5 y el 80%, con la cepa *Lact. composti* LBH1074 presentando la mayor hidrofobicidad. A pesar de la gran variación en los valores de hidrofobicidad en el estudio de estos investigadores, algunas de las cepas estudiadas en la presente tesis presentaron un mayor porcentaje de hidrofobicidad.

7.3.2. Autoagregación

La autoagregación se ha asociado con la capacidad de las cepas ácido lácticas para inhibir microorganismos patógenos, que depende de la concentración de microorganismos beneficiosos en la mucosa del tracto gastrointestinal. Asimismo, esta característica también se ha relacionado con la capacidad de las BAL para adherirse al epitelio intestinal [130]. La autoagregación se evaluó a las 2, 4, 6, 20 y 24 h de incubación (Anexo 1). La capacidad de autoagregación de las bacterias de estudio a las 24 h de incubación resultó entre el 15 y el 34% (Tabla 11), con la cepa *Levilactobacillus brevis* UTMB2 (34.3%) presentando la mayor capacidad entre las cepas de pulque evaluadas. Por otro lado, el valor de autoagregación de la cepa control, *Lact. acidophilus*, fue muy superior (94%) al de las cepas de estudio.

En un estudio similar, Śliżewska et al. [130] evaluaron las propiedades probióticas de bacterias de la familia *Lactobacillaceae* aisladas de diferentes fuentes (plantas y aves). En ese estudio se evaluó la capacidad de autoagregación de 5 cepas ácido lácticas identificadas como *Lact. paracasei*, *Lact. plantarum*, *Lact. pentosus*, *Lact. reuteri* y *Lact.*

rhamnosus. Los autores reportaron porcentajes de autoagregación del 54 al 95%, obteniendo el mayor porcentaje con la cepa de *Lact. plantarum* (95%). En la presente tesis, la cepa de estudio *Lact. brevis* UTMB2 es la que obtuvo el porcentaje más cercano a lo reportado por estos autores.

7.3.3. Coagregación

La capacidad de coagregación constituye un buen indicador de la capacidad antimicrobiana de los microorganismos probióticos, dado que esta característica favorece la capacidad de adhesión al epitelio intestinal de los mismos [130, 134]. La capacidad de coagregación de las BAL de estudio se evaluó utilizando tres microorganismos de ensayo: *S. enterica* serovar Typhi ATCC 9992, *L. monocytogenes* LM-W207 y EPEC 2348/69. Los resultados de la coagregación se muestran en la Tabla 11. Las cepas ensayadas mostraron una alta capacidad de coagregación con todas las cepas coagregadas. Las capacidades de coagregación de las BAL con las cepas *S. Typhi*, *L. monocytogenes* y EPEC a las 24 h se encontraron en los siguientes intervalos: 83.4% a 88.2%, 83.6% a 87.6%, y 58.5% a 64.9%, respectivamente. Por su parte, el control probiótico *Lact. acidophilus* NCFM presentó porcentajes de coagregación del 88.2% 87.6% y 64%, con *S. Typhi*, *L. monocytogenes* y EPEC, respectivamente.

Tabla 11. Características de superficie celular de las bacterias lácticas del pulque: hidrofobicidad (cloroformo y hexano), autoagregación y coagregación (EPEC, *Listeria monocytogenes* y *S. enterica* serovar Typhi).

Cepa	%Hidrofobicidad		%Autoagregación ²	%Coagregación ²		
	Cloroformo	Hexano		EPEC	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Typhi</i>
<i>Lact. paracasei</i> RVG1	22.0 ± 0.2 ^g	6.1 ± 0.3 ^h	17.0 ± 0.3 ^g	58.6 ± 0.1 ^f	83.7 ± 0.5 ^d	87.3 ± 0.4 ^{a, b}
<i>Lact. plantarum</i> RVG2	29.4 ± 0.3 ^e	2.9 ± 0.3 ⁱ	27.0 ± 0.1 ^c	64.9 ± 0.1 ^a	85.8 ± 0.2 ^{b, c}	83.6 ± 0.2 ^f
<i>Lact. plantarum</i> RVG4	36.1 ± 0.3 ^d	19.7 ± 0.3 ^d	21.9 ± 0.2 ^e	61.4 ± 0.1 ^d	85.3 ± 0.3 ^c	86.5 ± 0.2 ^{b, c}
<i>Lact. plantarum</i> UTMB1	16.6 ± 0.1 ^h	8.1 ± 0.2 ^g	15.5 ± 0.3 ^h	62.3 ± 0.1 ^c	83.6 ± 0.1 ^d	83.4 ± 0.1 ^f
<i>Lact. brevis</i> UTMB2	91.5 ± 0.4 ^b	53.0 ± 0.3 ^b	34.3 ± 0.5 ^b	59.5 ± 0.1 ^e	83.8 ± 0.3 ^d	85.4 ± 0.1 ^{d, e}
<i>Lact. paracasei</i> UTMB4	26.9 ± 0.2 ^f	12.6 ± 0.3 ^e	20.3 ± 0.1 ^f	64.4 ± 0.1 ^b	86.6 ± 0.0 ^{a, b}	85.9 ± 0.2 ^{c, d}
<i>Lact. paracasei</i> UTMB7	25.8 ± 1.0 ^f	21.6 ± 0.3 ^c	19.5 ± 0.0 ^f	62.2 ± 0.1 ^c	84.7 ± 0.0 ^{c, d}	84.7 ± 0.3 ^e
LA ¹	95.7 ± 0.1 ^a	55.2 ± 0.3 ^a	94.1 ± 0.1 ^a	64.1 ± 0.0 ^b	87.6 ± 0.4 ^a	88.2 ± 0.4 ^a

Los resultados se expresan como la media ± DE (n = 2).

Las letras corresponden a los resultados de la prueba de Tukey (p < 0.05); letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas en la prueba de Tukey.

¹LA, cepa de control de *Lactobacillus acidophilus* NCFM.

²24 h de incubación

En general, en esta prueba se observaron porcentajes de coagregación más elevados con los cultivos de *L. monocytogenes* y *S. Typhi*. Por otra parte, algunas de las cepas ácido lácticas estudiadas mostraron valores de coagregación iguales a los del control *Lact. acidophilus* NCFM. La cepa *Lactiplantibacillus plantarum* RVG2 presentó el mayor valor de coagregación con EPEC, mismo que fue incluso superior al de la cepa probiótica control. Adicionalmente, las cepas *Lacticaseibacillus paracasei* UTMB4 y *Lacticaseibacillus paracasei* RVG1 presentaron los valores de coagregación más altos para *L. monocytogenes* y *S. Typhi*, que fueron estadísticamente similares ($p < 0.05$) a los del control probiótico.

En un trabajo similar, Śliżewska et al. [130] evaluaron la capacidad de coagregación de 5 cepas ácido lácticas identificadas como *Lact. paracasei*, *Lact. plantarum*, *Lact. pentosus*, *Lact. reuteri* y *Lact. rhamnosus* y bacterias patógenas como *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*. Los autores reportaron porcentajes de autoagregación del 58% al 82% y del 12% al 65% con *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*, respectivamente. La cepa *Lact. pentosus* presentó el mayor porcentaje de coagregación con *L. monocytogenes* (82%), mientras que la cepa *Lact. paracasei* presentó el mayor porcentaje de coagregación con *Salmonella*. Estos resultados son inferiores, en la mayoría de los casos, a los obtenidos con las cepas del presente estudio con bacterias de pulque.

7.4. Evaluación de seguridad

7.4.1. Resistencia a antibióticos

La resistencia a los antibióticos ha aumentado considerablemente en las sociedades modernas y actualmente se considera un problema de salud pública mundial. Esta resistencia se ha atribuido principalmente a mecanismos de transferencia de genes [10, 12]. Considerando lo anterior, las cepas de BAL del pulque fueron evaluadas por el método de difusión en agar contra 15 antibióticos de interés para la salud humana. Los resultados de la resistencia a antibióticos de las cepas de estudio se presentan en la Tabla 12. Las BAL de estudio presentaron en su mayoría sensibilidad (S) y sensibilidad intermedia (I) a los antibióticos utilizados en el ensayo de difusión en agar.

En general, las cepas mostraron resistencia a no más de 3 de los antibióticos probados. La mayoría de las BAL del pulque mostraron resistencia a ciprofloxacina y ofloxacina, que pertenecen al grupo de las quinolonas. Sin embargo, esto está de acuerdo con informes anteriores que han reportado una alta resistencia a las quinolonas [74, 186]. Sharma et al.

[186] evaluaron la resistencia a los antibióticos de cepas de *Lactobacillus* spp. de productos probióticos comerciales, observando una alta resistencia de las cepas a las quinolonas, principalmente al ácido nalidíxico. Los mecanismos que se han asociado con la resistencia a las quinolonas son: (i) mutaciones puntuales en las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas (QRDRs) de los genes que codifican la girasa (*gyrA* y *gyrB*) y la topoisomerasa (*parC* y *parE*); (ii) disminución de la acumulación en el interior de las bacterias debido a la sobreexpresión de sistemas de bombas de eflujo; y (iii) resistencia a quinolonas mediada por plásmidos [187].

En este sentido, estudios previos han demostrado que la resistencia a quinolonas por BAL podría ser causada por más de un mecanismo. Los mecanismos más estrechamente relacionados con estas bacterias son: mutaciones puntuales en los QRDR y disminución de la acumulación dentro de las bacterias debido a la sobreexpresión de sistemas de bombas de eflujo [188]. De acuerdo a esto, la resistencia a quinolonas se asocia principalmente a mecanismos de resistencia intrínseca, ya que no es transferible; lo que se considera una característica positiva en una bacteria probiótica [74]. En general, los resultados obtenidos en el presente estudio son favorables comparados con los reportados por Colombo et al. [173] quienes evaluaron la resistencia de varias bacterias de la familia Lactobacillaceae a 12 antibióticos, reportando que las cepas de BAL no fueron resistentes a más de 7 antibióticos.

Tabla 12. Resistencia a antibióticos por el método de difusión en agar y actividad hemolítica de las bacterias lácticas del pulque.

Cepa	Resistencia a Antibióticos ^a															Actividad hemolítica ^{b,c}
	AMX	AMC	AZ	CFM	CFZ	XM	CI	C	SXT	EM	OF	P	PI	TE	VAN	
<i>Lact. paracasei</i> RVG1	I	S	S	R	I	I	R	I	I	S	I	I	S	S	I	γ
<i>Lact. plantarum</i> RVG2	S	S	S	S	I	S	R	S	I	S	R	S	S	I	S	α
<i>Lact. plantarum</i> RVG4	I	S	I	I	I	I	R	I	I	I	R	I	I	I	S	γ
<i>Lact. plantarum</i> UTMB1	S	S	I	I	I	I	R	I	S	I	R	I	I	I	I	α
<i>Lact. brevis</i> UTMB2	I	S	I	I	I	I	R	I	I	I	R	I	I	I	S	γ
<i>Lact. paracasei</i> UTMB4	S	S	S	R	I	I	I	I	I	S	I	I	S	S	S	γ
<i>Lact. paracasei</i> UTMB7	S	S	I	R	R	I	I	S	I	I	R	I	S	S	I	γ
LA ^d	S	S	S	I	I	S	I	S	I	S	S	S	S	I	S	γ
EPEC ^e	I	I	R	I	I	I	I	I	S	R	I	R	I	S	I	nd

Códigos de antibióticos: AMX = amoxicilina; AMC = amoxicilina/ácido clavulánico; AZ = azitromicina; CFM = cefalexina; CFZ = cefazolina; XM = cefuroxima; CI = ciprofloxacino; C = cloranfenicol; SXT = cotrimoxazol; EM = eritromicina; OF = ofloxacina; P = penicilina; PI = piperacilina; TE = tetraciclina; VAN = vancomicina.

nd, no determinado.

^aCódigos de sensibilidad a los antibióticos: S = Sensible (≥ 30 mm); I = Intermedia (16-29 mm); R = Resistente (≤ 15).

^bHalo transparente, actividad β -hemolítica; ii) halo verde, α -hemolítica; iii) sin halo, γ -hemolítica.

^cActividad β -hemolítica con *L. monocytogenes* (control positivo)

^dLA, *Lactobacillus acidophilus* NCFM cepa probiótica de control

^eEPEC, *Escherichia coli* enteropatógena

Adicionalmente, para corroborar aún más la seguridad de las BAL de estudio, se determinó mediante PCR la expresión de genes relacionados con la resistencia a los antibióticos. En el ensayo de PCR, las cepas probadas no presentaron genes relacionados con resistencia a antibióticos, con excepción de *Lact. paracasei* UTMB4 que mostró la presencia del gen asociado con la resistencia a los betalactámicos (*mecA*) (Tabla 13). Adicionalmente, los genes *mecA*, *tetM*, *tetS* y *vanA* se amplificaron con éxito en sus respectivos controles positivos. De acuerdo con la literatura, la resistencia a los betalactámicos está asociada a los genes *mecA*, *blaZ*, *bla* e *int-Tn* (*Tn916/Tn1545*) [74]. Debido a que este trabajo sólo se evaluó el gen *mecA*, para obtener resultados concluyentes en cuanto a la resistencia de las cepas de estudio a los betalactámicos es necesario evaluar los demás genes asociados a esta resistencia.

7.4.2. Detección de factores de virulencia

En la literatura científica se han descrito una serie de factores de virulencia que influyen en varios mecanismos celulares de patogenicidad, entre los que se encuentran los siguientes: la adherencia al tejido hospedador, la invasión celular, la formación de abscesos, la resistencia y modulación de los mecanismos de defensa del hospedador, la secreción de citolisinas y la producción de feromonas codificadas en plásmidos. De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo se evaluaron 10 genes asociados a factores de virulencia. De los genes evaluados, sólo el gen *agg* se amplificó en la cepa *Lact. plantarum* UTMB1 (Tabla 13). Este gen codifica para la síntesis de adhesina, una proteína de superficie, y sólo puede ser inducido por feromonas implicadas en la unión de la célula donante a las células receptoras libres de plásmidos, promoviendo así la agregación celular [189]. Sin embargo, a partir del análisis de PCR se pudo observar que los genes asociados a la producción de feromonas no fueron expresados en la cepa UTMB1. Los genes relacionados con factores de virulencia ensayados en este trabajo se amplificaron con éxito en sus respectivos controles positivos.

Tabla 13. Aspectos de seguridad de las bacterias lácticas del pulque: genes asociados a la susceptibilidad a los antibióticos y genes de factores de virulencia

Cepa	Resistencia a antibióticos				Factores de virulencia									
	<i>mecA</i>	<i>tetM</i>	<i>tetS</i>	<i>vanA</i>	<i>cyIM</i>	<i>esp</i>	<i>cpd</i>	<i>ace</i>	<i>gelE</i>	<i>cyIA</i>	<i>ccf</i>	<i>Agg</i>	<i>efaA_{fs}</i>	<i>efaA_{fm}</i>
<i>Lact. paracasei</i> RVG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lact. plantarum</i> RVG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lact. plantarum</i> RVG4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lact. plantarum</i> UTMB1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Lact. brevis</i> UTMB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lact. paracasei</i> UTMB4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lact. paracasei</i> UTMB7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPEC	+	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>L. monocytogenes</i>	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>S. aureus</i>	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>E. faecalis</i>	nd	+	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd
<i>P. acidilactici</i>	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>E. faecium</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+

+, amplificación positiva; -, amplificación negativa; nd, no determinado.

7.4.3. Actividad hemolítica

Ciertos tipos de actividad hemolítica (β -hemolítica y α -hemolítica) se consideran factores de virulencia relevantes en la evaluación de seguridad de cepas con potencial probiótico, ya que estos mecanismos de virulencia están presentes principalmente en microorganismos patógenos [176]. De acuerdo con esto, en este trabajo se evaluó la actividad hemolítica de las cepas de estudio en un medio de cultivo de sangre (Tabla 12). Como resultados del ensayo, no se observaron halos alrededor de las estrías bacterianas de la mayoría de las cepas ensayadas, incluido el control negativo *Lact. acidophilus* NCFM, lo que indica un comportamiento γ -hemolítico (Figura 6a). Sólo las cepas *Lact. plantarum* UTMB1 y *Lact. plantarum* RVG2 presentaron actividad α -hemolítica, mientras que *L. monocytogenes* LM-W207, el control positivo, presentó actividad β -hemolítica (Figura 6b). Por lo tanto, a partir de estos resultados, se puede inferir que la mayoría de las cepas de BAL ensayadas pueden considerarse seguras en términos de su actividad hemolítica.

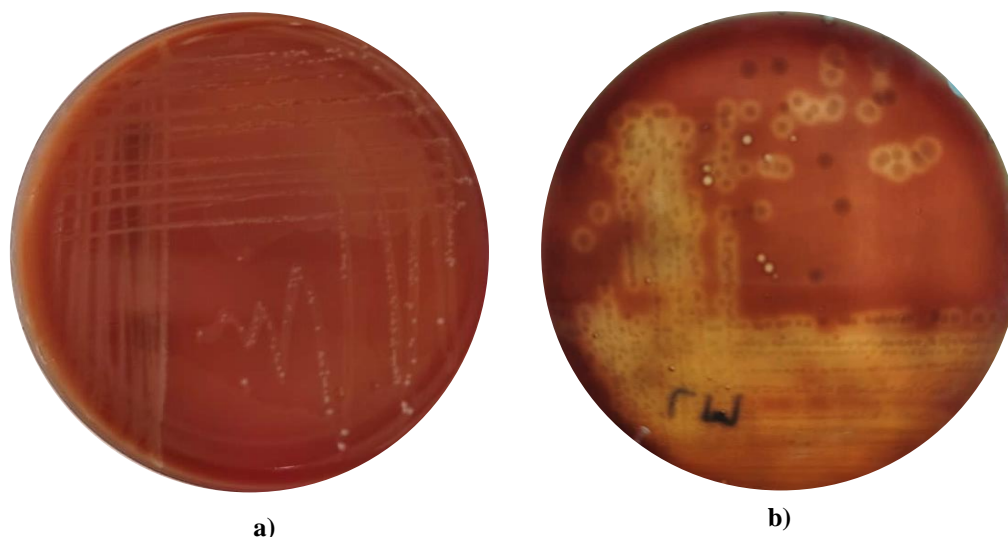


Figura 6. Ejemplo de la prueba de actividad hemolítica: a) BAL (γ -hemolítico) y b) *L. monocytogenes* (β -hemolítico).

7.5. Caracterización funcional

Para una evaluación completa de la capacidad benéfica de una cepa BAL, además de la actividad probiótica y la caracterización de la seguridad, es deseable que la cepa proporcione una contribución benéfica adicional para la salud humana, es decir, una actividad funcional [178]. Por lo anterior, se evaluaron las siguientes características

funcionales: actividad antioxidante (AA), actividad β -galactosidasa y reducción de colesterol (RC).

7.5.1. Actividad antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante de las cepas estudiadas mediante el ensayo del radical DPPH (Tabla 14). Todas las BAL de estudio presentaron actividad antioxidante que resultaron entre el 24 y el 35%, siendo superiores en todos los casos a la cepa probiótica control *Lact. acidophilus* NCFM. La actividad antioxidante fue superior al 20% en todas las BAL estudiadas, lo que concuerda con reportes similares en la literatura para cepas ácido lácticas [177, 178]. La actividad antioxidante de los probióticos está asociada a la regulación de las condiciones del tracto gastrointestinal, actuando, así como barrera protectora frente a microorganismos patógenos [178].

7.5.2. Actividad β -galactosidasa

La digestión de la lactosa en el ser humano ocurre por la acción hidrolítica de la enzima β -galactosidasa, por lo que la deficiencia de esta enzima en el organismo se asocia al padecimiento de intolerancia a la lactosa. Esta deficiencia provoca molestias gástricas como dolor abdominal, diarrea, flatulencia, náuseas, etc., en quien la padece [178, 179]. En el ensayo de actividad β -galactosidasa realizado en este trabajo, todas las cepas BAL de estudio, incluido el control *Lact. acidophilus* NCFM, dieron lugar al desarrollo de colonias azules en el medio de detección (Tabla 14), lo que es indicativo de la hidrólisis de lactosa (Figura 7). Por su parte, la cepa control, *Lact. acidophilus* NCFM, presentó una notable actividad β -galactosidasa comparable con las cepas ácido lácticas de estudio. Considerando que todas las cepas de BAL del pulque y el control positivo presentaron actividad β -galactosidasa, el consumo de estos microorganismos puede ser recomendado para aliviar el padecimiento de intolerancia a la lactosa [178].

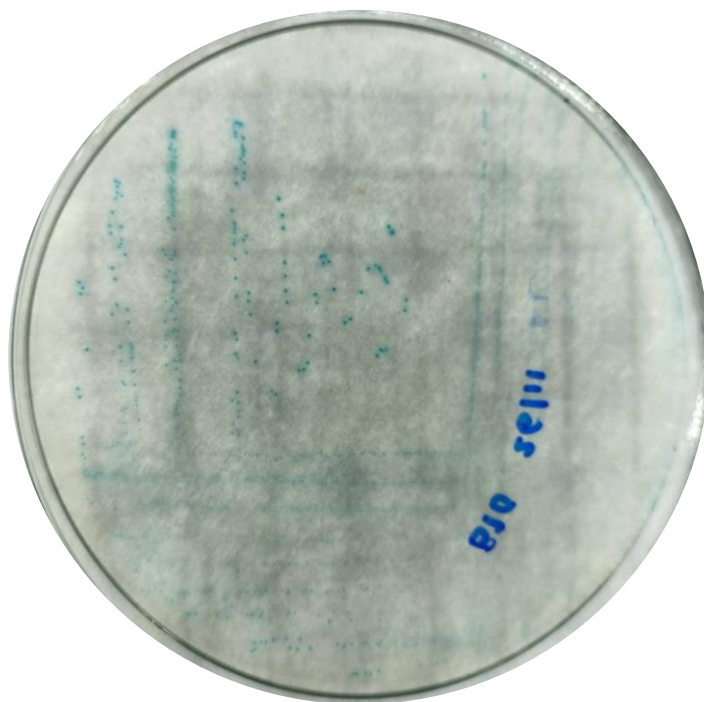


Figura 7. Fotografía ejemplificativa de la prueba de actividad hemolítica con actividad positiva β -galactosidasa.

Tabla 14. Rasgos funcionales de las bacterias lácticas del pulque: actividad antioxidante; actividad β -galactosidasa; y reducción del colesterol.

Cepa	Actividad antioxidante (%)	Actividad β -galactosidasa ¹	Reducción de colesterol (%)
<i>Lact. paracasei</i> RVG1	26.1 \pm 0.5 ^d	+	16.7 \pm 0.3 ⁱ
<i>Lact. plantarum</i> RVG2	24.7 \pm 0.6 ^e	+	37.2 \pm 0.3 ^d
<i>Lact. plantarum</i> RVG4	26.3 \pm 0.7 ^d	+	43.3 \pm 0.4 ^b
<i>Lact. plantarum</i> UTMB1	28.6 \pm 0.3 ^c	+	36.2 \pm 0.2 ^e
<i>Lact. brevis</i> UTMB2	35.6 \pm 0.6 ^a	+	39.5 \pm 0.3 ^c
<i>Lact. paracasei</i> UTMB4	32.6 \pm 0.2 ^b	+	23.8 \pm 0.4 ^h
<i>Lact. paracasei</i> UTMB7	33.0 \pm 0.6 ^b	+	30.8 \pm 0.3 ^g
LA ²	6.6 \pm 0.2 ^f	+	48.5 \pm 0.0 ^a

* Los resultados se expresan como la media \pm DE (n = 3). Las letras corresponden a los resultados de la prueba de Tukey (p < 0.05), letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas en la prueba de Tukey

¹(-) sin actividad; (+) actividad

²LA, cepa control *Lactobacillus acidophilus* NCFM

7.5.3. Reducción de colesterol

La hipercolesterolemia es una de las principales causas de enfermedades cardiovasculares en todo el mundo [190]. En estudios recientes, se ha informado que algunas cepas ácido lácticas pueden reducir el nivel de colesterol en el intestino, por lo que en este trabajo se evaluó la capacidad de reducción de colesterol de las BAL de estudio y el control probiótico. Las BAL de estudio redujeron el colesterol con valores que variaron entre el 16.7 y el 43.3% (Tabla 14). Entre las cepas de estudio ensayadas, *Lactiplantibacillus plantarum* RVG4 produjo la mayor reducción de colesterol con un 43.3%, un valor que fue estadísticamente inferior ($p < 0,05$) al causado por la cepa control *Lact. acidophilus* NCFM (48.5%).

De acuerdo con la literatura, una disminución del 1% del colesterol podría reducir el riesgo de enfermedad coronaria entre un 2% y un 3% [190]. Por lo tanto, las BAL del pulque estudiadas en este trabajo, pueden tener una influencia considerable en la disminución del colesterol en sistemas *in vivo*. En relación con esto, otros autores han reportado porcentajes de reducción de colesterol entre el 50% y el 59% por cepas marinas de *Lact. casei* [180]. Li et al. [185] realizaron estudios *in vitro* e *in vivo* de las propiedades probióticas de BAL aisladas de masa madre tradicional china. Los autores realizaron un ensayo de reducción del colesterol y reportaron valores del 20 al 30% para las cepas de *Lact. plantarum*, mismos que están dentro del rango de los resultados obtenidos en el presente estudio. En otro estudio, se estudiaron las propiedades hipocolesterolémicas de dos cepas de *Levilactobacillus brevis* tanto *in vitro* como *in vivo*. Las cepas redujeron el contenido de colesterol, aumentaron la excreción fecal de colesterol y convirtieron la bilis en ácido cólico libre [191].

7.6. Análisis multivariable

7.6.1. Análisis de componentes principales (ACP) y mapa de calor

Para una selección sistemática de los mejores candidatos probióticos, se realizó un análisis multivariante mediante ACP y la evaluación de mapas de calor de los datos obtenidos a partir de la caracterización probiótica de las cepas de BAL ensayadas y el control *Lact. acidophilus* NCFM. Los parámetros considerados fueron los siguientes: resistencia a lisozima, jugo gástrico, jugo intestinal y jugo gástrico/jugo intestinal, así como hidrofobicidad, autoagregación y coagregación. A partir del análisis ACP se obtuvieron dos componentes principales (PC1 y PC2) con una cobertura de la varianza total del 70.8% (Figura 8). El componente PC1 cubre la varianza máxima de los datos (48.7%), mientras

que el componente PC2 cubre el resto de la varianza (22.1%). Las cepas se agruparon en cuatro cuadrantes teniendo en cuenta su rendimiento en las pruebas de actividad probiótica: I: NCFM y UTMB4; II: UTMB1; III: RVG1 y RVG2; IV: UTMB2, UTMB7 y RVG4. Los atributos de hidrofobicidad, autoagregación, jugo gástrico y jugo gástrico/intestinal fueron determinantes para la categorización de las BAL, ya que estos parámetros explican en mayor medida la variabilidad de las bacterias probadas. De acuerdo con el análisis de ACP (Figura 8), las cepas *Lact. acidophilus* NCFM y *Lact. paracasei* UTMB4 se sitúan en el cuadrante I, presentando los mejores resultados en cuanto a características de superficie celular, y en general, resultados favorables en el resto de las características de actividad probiótica.

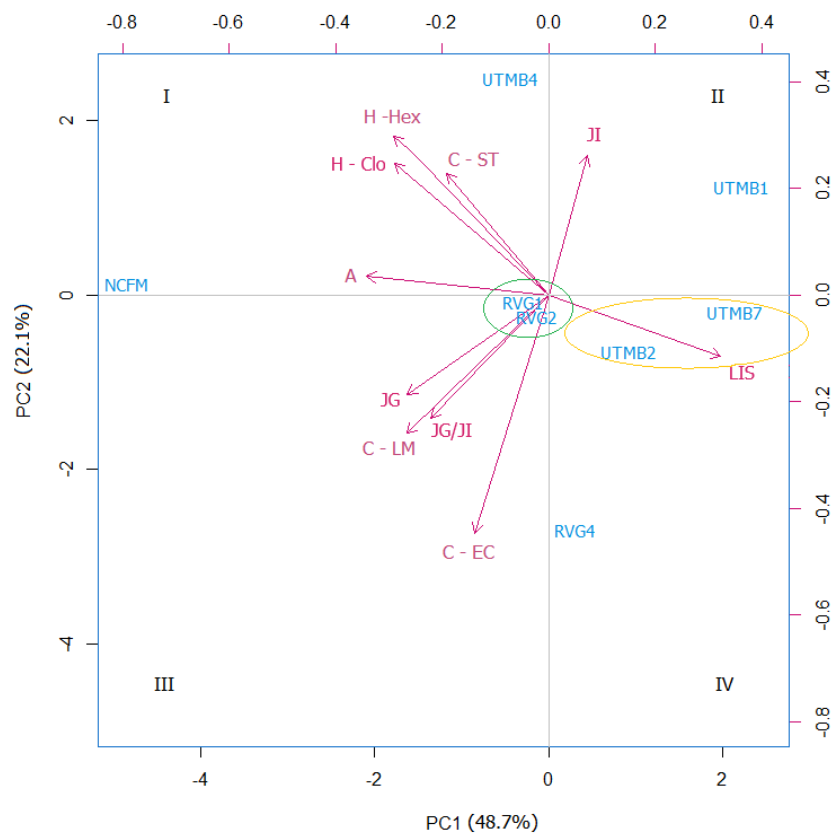


Figura 8. Análisis de componentes principales (ACP) para las bacterias lácticas del pulque y el control positivo *Lactobacillus acidophilus* NCFM, considerando los atributos para la determinación de la actividad probiótica *in vitro*: resistencia al jugo gástrico (JG), jugo intestinal (JI), jugo gástrico/jugo intestinal (JG/JI), lisozima (LIS), así como hidrofobicidad (H; -Hex: hexano; -Clo: cloroformo), autoagregación (A) y coagregación (C; -LM: *Listeria monocytogenes*; EC: EPEC; ST: *Salmonella enterica serovar Typhi*).

Adicionalmente, los datos de caracterización probiótica también se representaron en términos de variaciones de intensidad de color mediante un mapa de calor (Figura 9). El mapa de calor proporcionó la categorización de las cepas ácido lácticas en relación a sus atributos probióticos, en el que las cepas bacterianas se agruparon en 6 clusters: NCFM, UTMB4, RVG4, RVG1-RVG2, UTMB2-UTMB7 y UTMB1. Considerando el ACP y el mapa de calor, la cepa RVG4 es la bacteria más cercana a la cepa UTMB4; por lo tanto, la cepa RVG4 puede ser considerada como el segundo mejor candidato probiótico de las cepas del pulque probadas en este estudio. Adicionalmente, las cepas RVG1 y RVG2 constituyen el tercer grupo más cercano a la cepa probiótica comercial *Lact. acidophilus* NCFM. En consecuencia, las cepas RVG1 y RVG2 pueden considerarse buenas candidatas probióticas. Un factor muy decisivo para el posicionamiento final de las cepas lácticas en relación a su potencial probiótico fue su resistencia al jugo gástrico; sin embargo, para mejorar la resistencia bacteriana a esta condición estresante, es posible aplicar la tecnología de microencapsulación celular [183]. Teniendo esto en cuenta, la cepa UTMB2 (cuadrante IV) también puede considerarse un buen candidato probiótico, especialmente debido a sus notables propiedades de superficie celular.

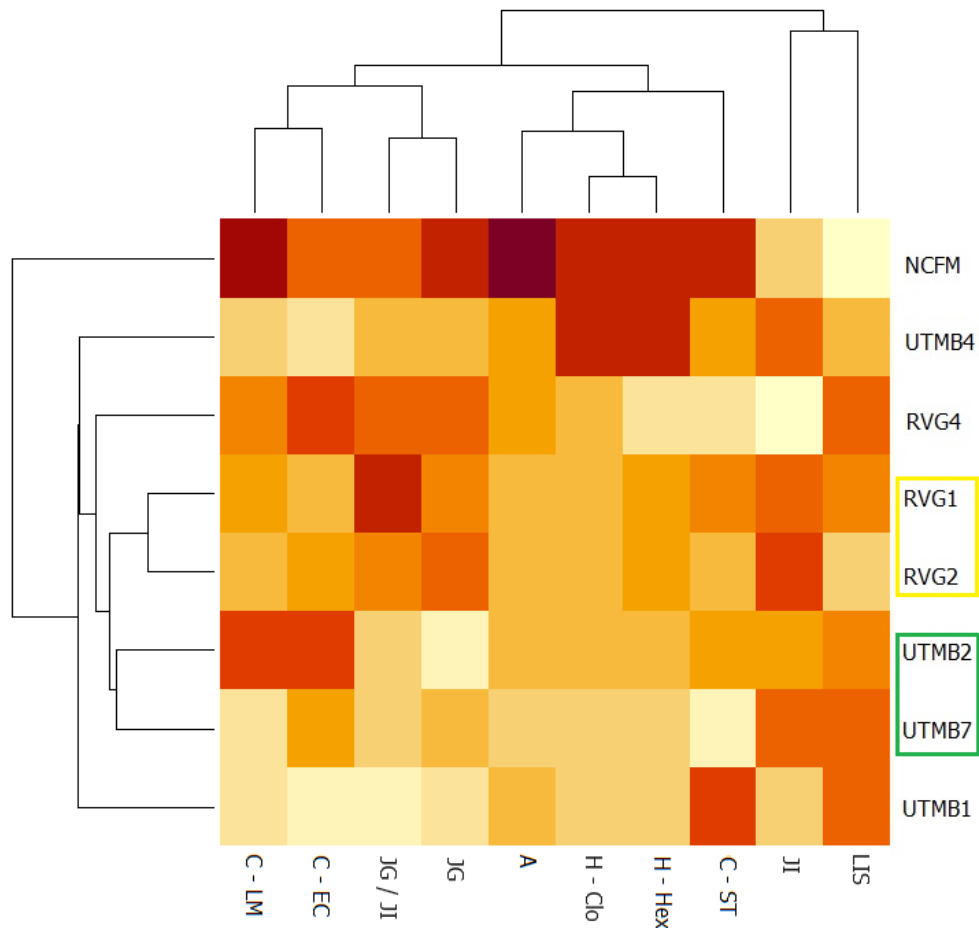


Figura 9. Mapa de calor para las bacterias lácticas del pulque y el control positivo *Lactobacillus acidophilus* NCFM, considerando los atributos para la determinación de la actividad probiótica *in vitro*: resistencia al jugo gástrico (JG), jugo intestinal (JI), jugo gástrico/jugo intestinal (JG/JI), lisozima (LIS), así como hidrofobicidad (H; -Hex: hexano; -Clo: cloroformo), autoagregación (A) y coagregación (C; -LM: *Listeria monocytogenes*; EC: EPEC; ST: *Salmonella enterica serovar Typhi*).

7.6.2. Análisis de correlación

De acuerdo a la literatura científica, la resistencia a sales biliares y la reducción del colesterol están relacionadas con la producción de HSB. Como se ha mencionado anteriormente, el principal mecanismo de resistencia a las sales biliares es la síntesis de enzimas hidrolasas de sales biliares. Por otro lado, uno de los mecanismos propuestos para explicar la reducción del colesterol mediada por cepas ácido lácticas es la desconjugación enzimática de los ácidos biliares por las enzimas BSH [184]. Considerando lo anterior, en el presente trabajo se realizaron gráficos de dispersión para obtener la correlación entre la

actividad hidrolasa de sales biliares y las variables: resistencia a sales biliares (Figura 10), y reducción de colesterol (Figura 11).

La Figura 10 muestra la correlación entre la resistencia a sales biliares al 0.5% (SB 0.5%) de nuestro trabajo anterior (Ruiz-Ramírez et al., 2022) y la producción de la enzima HSB. Las cepas que presentaron mayores coeficientes de correlación para estas variables son *Lact. acidophilus* NCFM, *Lact. brevis* UTMB2, *Lact. plantarum* RVG2 y *Lact. plantarum* UTMB1. De manera similar, se realizó el análisis de correlación entre la producción de la enzima HSB y la reducción de colesterol. La correlación entre las variables HSB y la reducción del colesterol fue alta para todas las cepas estudiadas, incluyendo el control (Figura 11). De acuerdo con estos resultados, se puede concluir que para las cepas BAL de estudio, el nivel de correlación entre la HSB y la reducción de colesterol (Figura 11) es mayor que el existente entre la resistencia a sales biliares y la actividad HSB (Figura 10).

A partir de este ensayo, puede observarse que la cepa de pulque *Lact. brevis* UTMB2 presentó tanto la mayor resistencia a las sales biliares como una de las mayores productividades de la enzima HSB, con valores que fueron similares a los de la cepa control probiótica. Adicionalmente, la producción de BSH se correlacionó positivamente con la reducción del colesterol en todas las cepas estudiadas, incluida la cepa probiótica comercial. Por otra parte, la cepa con mayor producción de HSB y mayor porcentaje de reducción de colesterol fue la cepa NCFM, seguida de cerca por la cepa pulque UTMB2. En conclusión, la síntesis de enzimas HSB por las cepas BAL constituye el principal mecanismo implicado en la mejora de la resistencia celular a las sales biliares y en el efecto funcional de estas cepas para la reducción del colesterol.

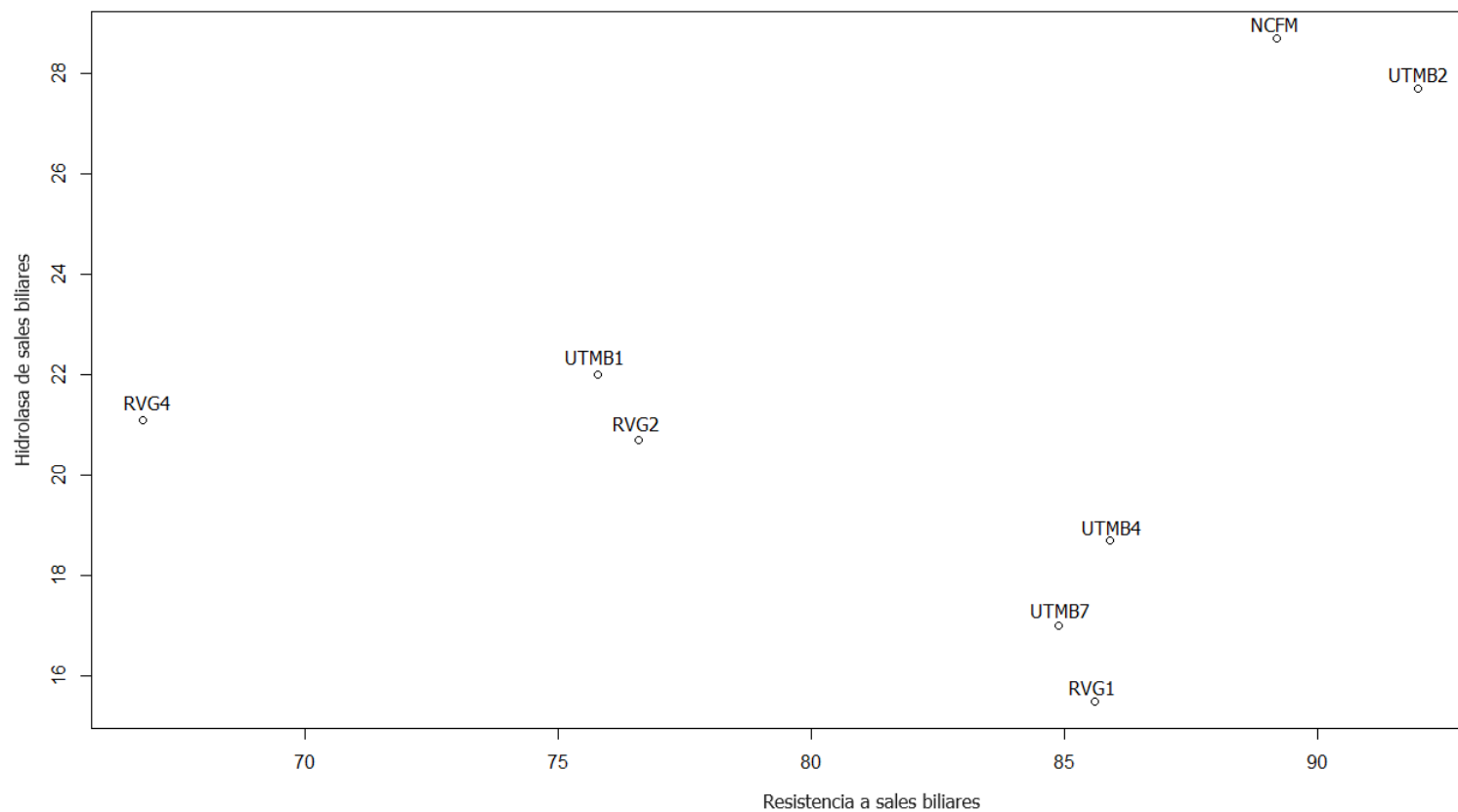


Figura 10. Diagrama de dispersión de la correlación entre las variables resistencia a sales biliares (%; SB 0.5%) [20] y producción de la enzima hidrolasa de sales biliares (mm de halo de inhibición).

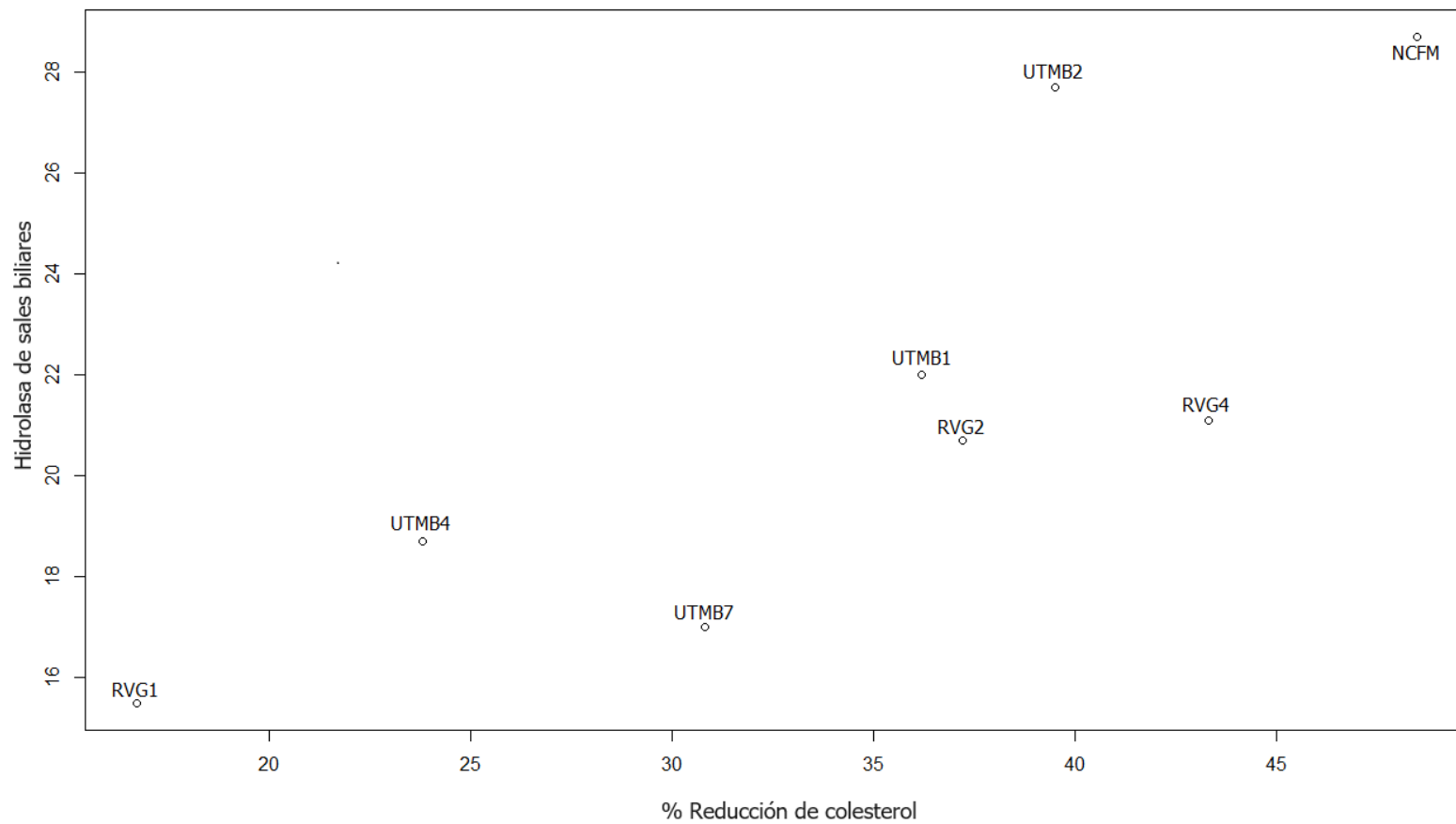


Figura 11. Diagrama de dispersión de la correlación entre las variables producción de enzima hidrolasa de sales biliares (mm de halo de inhibición) y reducción de colesterol (%).

8. CONCLUSIONES

Se identificaron 7 bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales pertenecen a la familia Lactobacillaceae a los géneros: *Lacticaseibacillus paracasei*, *Levilactobacillus brevis* y *Lactiplantibacillus plantarum*.

Después de realizar las pruebas de potencial probiótico a las 7 cepas de estudio, todas presentaron resistencia a lisozima por arriba del 50%, valores que fueron mayores a los del control positivo *Lact. acidophilus* NCFM. Las BAL también fueron expuestas a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal presentando resultados entre el 25 y 44% de sobrevivencia, por lo cual esta condición se considera como la más dañina para las bacterias. Además, las BAL de estudio presentaron actividad hidrolasa de sales biliares y actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*.

Por otra parte, las cepas BAL presentaron, en la mayoría de los casos, valores bajos en las características de superficie celular, excepto *Lact. brevis* que obtuvo valores cercanos al control positivo. La mayoría de las cepas de estudio se pueden considerar seguras, porque no presentaron resistencia a antibióticos y factores de virulencia. Adicionalmente, las BAL presentaron características funcionales relevantes como son: actividad antioxidante, β -galactosidasa y reducción de colesterol.

El presente estudio proporciona evidencia del potencial probiótico de las BAL aisladas del pulque, por lo que ayuda a demostrar que el pulque puede ser considerado como una excelente fuente de microorganismos benéficos. Las cepas de BAL probadas en este trabajo mostraron resultados favorables en la mayoría de las pruebas de actividad probiótica y seguridad realizadas en este estudio, en comparación con la cepa probiótica comercial *Lact. acidophilus* NCFM. En general, considerando los resultados de agrupamiento obtenidos con herramientas de análisis multivariado utilizadas en este trabajo (ACP y mapa de calor) las cepas de pulque con mayor potencial probiótico fueron *Lact. paracasei* UTMB4, *Lact. plantarum* RVG4 y *Lact. brevis* UTMB2; sin embargo, la cepa UTMB4 expresó un gen relacionado con la resistencia a antibióticos betalactámicos.

Considerando lo anterior, las cepas de BAL del pulque ensayadas podrían ser empleadas en la elaboración de diversos alimentos fermentados y funcionales para dotarlos de características probióticas específicas. Sin embargo, son necesarios estudios *in vivo* para poder afirmar la naturaleza probiótica y las características de seguridad de las cepas probadas.

9. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se realizaron las principales pruebas *in vitro* para la determinación del potencial probiótico, que incluyen pruebas de resistencia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, pruebas de seguridad y propiedades de adhesión. Se propone realizar pruebas de adhesión al epitelio intestinal en líneas celulares. Además, realizar la secuenciación de los genomas completos de las cepas con alto potencial probiótico, para poder caracterizarlas completamente y realizar la evaluación *in silico* de las características probióticas.

Asimismo, se propone el uso de técnicas de microencapsulación en las cepas que presentaron baja tolerancia al jugo gástrico y que presentaron buenas características funcionales. Otra propuesta, es el uso combinado de algunas de las bacterias que presentaron las mejores características probióticas.

Por otra parte, en este estudio también se realizaron pruebas *in vitro* de características funcionales específicas como actividad antioxidante, actividad β -galactosidasa y reducción de colesterol. En este sentido, sería adecuado evaluar los mecanismos de acción y posteriormente evaluar *in vivo* estas actividades. Finalmente, se propone realizar estudios clínicos a las cepas con alto potencial probiótico.

10. REFERENCIAS

- [1] Vijayalakshmi, S., Adeyemi, D.E., Choi, I.Y., Sultan, G., Madar, I.H., Park, M.K. (2020). Comprehensive *in silico* analysis of lactic acid bacteria for the selection of desirable probiotics. *Lwt – Food Science and Technology*. 130 109617. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109617>.
- [2] Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., Arendt, E.K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100 1121–1135. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7172-2>.
- [3] Rastogi, Y.R., Thakur, R., Thakur, P., Mittal, A., Chakrabarti, S., Siwal, S.S., Thakur, V.K., Saini, R.V., Saini, A.K. (2022). Food fermentation - Significance to public health and sustainability challenges of modern diet and food systems. *Int J Food Microbiol*. 16;371:109666. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109666>.
- [4] Chaiyasut, C., Tirawat, Y., Sivamaruthi, B.S., Kesika, P., Thangaleela, S., Khongtan, S., Khampithum, N., Peerajan, S., Chaiyasut, K., Sirilun, S., Sittiprapaporn, P. (2021). Effect of *Lactobacillus paracasei* H1101 supplementation on total cholesterol, and on the parameters of lipid and carbohydrate metabolism, oxidative stress, inflammation and digestion in thai hypercholesterolemic Subjects. *Applied Sciences*. 11(10):4333. <https://doi.org/10.3390/app11104333>.
- [5] Khongrum, J., Yingthongchai, P., Boonyapranai, K., Wongtanasarasin, W., Aobchecy, P., Tateing, S., Prachansuwan, A., Sitdhipol, J., Niwasabutra, K., Thaveethaptaikul, P., Phapugrangkul, P., Chonpathompikunlert P. (2023). Safety and effects of *Lactobacillus paracasei* TISTR 2593 supplementation on improving cholesterol metabolism and atherosclerosis-related parameters in subjects with hypercholesterolemia: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Nutrients*. 15(3):661. <https://doi.org/10.3390/nu15030661>.
- [6] Ayivi, R.D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S.O., Worku, M., Tahergorabi, R., Silva, R.Cd., Ibrahim, S.A. (2020). Lactic acid bacteria: food safety and human health applications. *Dairy*. 1(3):202-232. <https://doi.org/10.3390/dairy1030015>

- [7] Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. (2014). The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 11 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- [8] Kerry RG, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *J Food Drug Anal.* Jul;26(3):927-939. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>.
- [9] Markowiak, P., Śliżewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients.* 15;9(9):1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>.
- [10] Pradhan, D., Mallappa, R.H., Grover, S. (2020). Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. *Food Control.* 108:106872. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106872>.
- [11] Lakhlifi, T., El oirdi, S., Maroui, I., Zouhair, R., Belhaj, A. (2023). Probiotic properties and safety aspect of three antifungal lactic acid bacteria strains isolated from wheat and camel milk. *Biologia.* 78:1129–1139. <https://doi.org/10.1007/s11756-023-01319-4>.
- [12] Fan, X., Jiang, X., Guo, Y., Zhang, T., Zeng, X., Wu, Z., Pan, D. (2023). *In vitro* and *in vivo* evaluation of the safety of *Levilactobacillus brevis* CGMCC1.5954 with probiotic potential based on tri-generation whole genome sequencing and animal studies. *Food Bioscience.* 53:102654. <https://doi.uam.elogim.com/10.1016/j.fbio.2023.102654>.
- [13] Alvarez-Cisneros, Y.M., Fernández, F.J., Sainz-Espuñez, T., Ponce-Alquicira, E. (2017). Assessment of virulence factors, antibiotic resistance and amino-decarboxylase activity in *Enterococcus faecium* MXVK29 isolated from Mexican chorizo. *Lett Appl Microbiol.* 64(2):171-176. <https://doi.org/10.1111/lam.12699>.
- [14] Gutiérrez-Urbe, J.A., Figueroa, L.M., Martín-del-Campo, S.T., Escalante, A. (2017). “Pulque,” in *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, eds J. Frias, C. Martinez-Villaluenga, E. Peñas. (Cambridge: Academic Press). 543–556. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00023-6>

- [15] Escalante, A., López Soto, D.R., Velázquez Gutiérrez, J.E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: Historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*. 7:1026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>
- [16] Chacón-Vargas, K., Torres, J, Giles-Gómez, M., Escalante, A., Gibbons, J.G. (2020). Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. *Scientific Reports*. 10:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71864-4>
- [17] Castro-Rodríguez, D., Hernández-Sánchez, H., Yáñez Fernández, J. (2015). Probiotic properties of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from aguamiel of *Agave salmiana*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 7:107–117. <https://doi.org/10.1007/s12602-015-9187-5>.
- [18] Giles-Gómez, M., Sandoval García, J.G., Matus, V., Campos Quintana, I., Bolívar, F., Escalante, A. (2016). *In vitro* and *in vivo* probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage. *Springerplus* 5:708. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2370-7>
- [19] Torres-Maravilla, E., Lenoir, M., Mayorga-Reyes, L., Allain, T., Sokol, H., Langella, P., Sánchez-Pardo, M.E., Bermúdez-Humarán, L.G. (2016). Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100: 385–396. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7049-4>.
- [20] Ruíz-Ramírez, Y., Guadarrama-Mendoza, P.C., Escalante, A., Giles-Gómez, M., Valadez-Blanco, R. (2022). Probiotic activity traits *in vitro* and production of antimicrobial peptides by *Lactobacillaceae* isolates from pulque using *Lactobacillus acidophilus* NCFM as control. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00684-7>.
- [21] König, H., Fröhlich, J. (2009). Lactic acid bacteria. In: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (eds) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0_1.
- [22] Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., Geng, W. (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding

applications in food industry. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:612285.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>.

- [23] Wyszy, A., Kobierecka, P. (2015). Lactic acid bacteria — 20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. 2967–77.
- [24] Orla-Jensen, S. (1919). *The lactic acid bacteria*; Andr Fred Host and Sons imp: Copenhagen, Denmark.
- [25] Quinto, E.J., Jimenez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., Girbes, T. (2014). Probiotic lactic acid bacteria: A review. *Food Nutr. Sci.* 5, 1765–1775.
- [26] Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1171–1185.
- [27] Mokoena, M. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules.* 22:1255.
<https://doi.org/10.3390/molecules22081255>.
- [28] Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C., Harris, H., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 2782–2858.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- [29] König, H., Fröhlich, J. (2017). Lactic acid bacteria. In: König H, Uden G, Fröhlich J, editors. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Second Edi. Springer. p. 3–41.
- [30] De, A.M., Calasso, M., Cavallo, N., Di Cagno, R., Gobbetti, M. (2016) Functional proteomics within the genus *Lactobacillus*. *Proteomics.* 16(6):946-62.
<https://doi.org/10.1002/pmic.201500117>.
- [31] Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (1983). Molecular systematics of prokaryotes. *Annu Rev Microbiol.* 37:143–187.

- [32] Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D.R., da Costa, M.S., Rooney, A.P., Yi, H., Xu, X.W., De Meyer, S., Trujillo, M.E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 68(1):461-466. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>.
- [33] Konstantinidis, K.T., Tiedje, J.M. (2005). Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *J Bacteriol.* 187:6258–6264. <https://doi.org/10.1128/JB.187.18.6258-6264.2005>
- [34] Wittouck, S., Wuyts, S., Meehan, C.J., van Noort, V., Lebeer, S. (2019). A genome-based species taxonomy of the *Lactobacillus* Genus Complex. *mSystems.* 4:e00264–19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00264-19>.
- [35] Liu, W., Pang, H., Zhang, H., Cai, Y. (2014). Biodiversity of lactic acid bacteria. In *lactic acid bacteria*; Zhang, H., Cai, Y., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands. pp. 103–203. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8841-0_2
- [36] Hooper, L.V., Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol.* 10(3):159-69. <https://doi.org/10.1038/nri2710>.
- [37] Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* 36:527–543. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00009-7).
- [38] Ojeda-Linares, C., Álvarez-Ríos, G.D., Figueredo-Urbina, C.J., Islas, L.A., Lappe-Oliveras, P., Nabhan, G.P., Torres-García, I., Vallejo, M., Casas, A. (2021). Traditional fermented beverages of Mexico: A biocultural unseen foodscape. *Foods.* 9;10(10):2390. <https://doi.org/10.3390/foods10102390>
- [39] Zorba, M., Hancioglu, O., Genc, M., Karapinar, M., Ova, G. The use of starter cultures in the fermentation of boza, a traditional Turkish beverage. *Process. Biochem.* 2003;38:1405–1411. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00033-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00033-5).
- [40] Kebede, A., Viljoen, B., Gadaga, T., Narvhus, J., Lourens-Hattingh, A. (2007). The effect of container type on the growth of yeast and lactic acid bacteria during production of Sethemi, South African spontaneously fermented milk. *Food Res. Int.* 40:33–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.07.012>.

- [41] Gupta, R.; Jeevaratnam, K., Fatima A. (2018). Lactic acid bacteria: Probiotic characteristic, selection criteria, and its role in human health (A review). *J. Emerg. Technol. Innov. Res. (JETIR)*. 5, 411–424.
- [42] Romero-Luna, H.E., Hernández-Sánchez, H., Dávila-Ortiz, G. (2017) Traditional fermented beverages from Mexico as a potential probiotic source. *Ann. Microbiol.* 67:577–586. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1290-2>.
- [43] Pérez-Armendáriz, B., Cardoso-Ugarte, G. (2020). Traditional fermented beverages in Mexico: Biotechnological, nutritional, and functional approaches. *Food Res. Int.* 136:109307. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109307>.
- [44] Robledo-Márquez, K., Ramírez, V., González-Córdova, A., Ramírez-Rodríguez, Y., García-Ortega, L., Trujillo, J. (2021). Research opportunities: Traditional fermented beverages in Mexico. Cultural, microbiological, chemical, and functional aspects. *Food Res. Int.* 147:110482. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110482>.
- [45] Ben, O.N., Ampe, F. (2000). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3664–3673. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3664-3673.2000>.
- [46] Nuraida, L., Wachter, M.C., Owens, J.D. (1995). Microbiology of pozol, a Mexican maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11:567–571. <https://doi.org/10.1007/BF00286375>.
- [47] Ray, P., Sanchez, C., O'sullivan, D.J., McKay, L.L. (2000). Classification of a bacterial isolate, from pozol, exhibiting antimicrobial activity against several Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts, and molds. *J. Food Prot.* 63(8):1123–1132. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.8.1123>.
- [48] Wachter, C., Cañas, A., Bárzana, E., Lappe, P., Ulloa, M., Owens, J.D. (2000). Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiol.* 17:251–256. <https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0310>.
- [49] Jiménez Vera, R., Gonzalez Cortes, N., Magaña Contreras, A., Corona Cruz, A. (2010). Microbiological and sensory evaluation of fermented white pozol, with cacao (*Theobroma cacao*) and coconut (*Cocos nucifera*) *Rev. Venez. Cienc. Technol. Aliment.* 1:70–80.

- [50] Wachter, C., Canas, A., Cook, P.E., Bárzana, E., Owens, J.D. (1993). Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9:269–274. <https://doi.org/10.1007/BF00327853>.
- [51] Díaz-Ruiz, G., Guyot, J., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyot, J., Wachter, C. (2003). Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: A functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4367–4374. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4367-4374.2003>.
- [52] Pérez-Cataluña, A., Elizaquível, P., Carrasco, P., Espinosa, J., Reyes, D., Wachter, C., Aznar, R. (2018). Diversity and dynamics of lactic acid bacteria in atole agrio, a traditional maize-based fermented beverage from South-Eastern Mexico, analysed by high throughput sequencing and culturing. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 111:385–399. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0960-1>.
- [53] Lappe, P., Ulloa, M., Gómez, J. (1989). Microbial and chromatographic study of tejuino from Jalisco, Mexico. *Rev. Mex. Microbiol.* 5:181–203.
- [54] Pérez-Armendáriz, B., Cardoso-Ugarte, G. (2020). Traditional fermented beverages in Mexico: Biotechnological, nutritional, and functional approaches. *Food Res. Int.* 136:109307. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109307>.
- [55] Lappe P., Ulloa M. (1989). *Estudios Étnicos, Microbianos y Químicos del Tesgüino Tarahumara*. Volume 1 UNAM; Mexico City, Mexico.
- [56] Álvarez-Ríos, G.D., Figueredo-Urbina, C.J., Casas, A. (2020). Physical, chemical, and microbiological characteristics of pulque: Management of a fermented beverage in Michoacán, Mexico. *Foods.* 9:361. <https://doi.org/10.3390/foods9030361>.
- [57] Escalante, A., López Soto, D.R., Velázquez Gutiérrez, J.E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: Historical, microbiological, and technical aspects. *Front. Microbiol.* 7:1026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>.
- [58] Santiago-Urbina, J.A., Ruíz-Terán, F. (2014). Microbiology and biochemistry of traditional palm wine produced around the world. *Int. Food Res. J.* 21:1261–1269.

- [59] Titilayo, F., Temitope, A. (2019). Microbiological and physicochemical changes in palm wine subjected to spontaneous fermentation during storage. *Int. J. Biotechnol.* 8:48–58.
- [60] Djeni, T.N., Kouame, K.H., Ake, F.D.M., Amoikon, L.S.T., Dje, M.K., Jeyaram, K. (2020). Microbial diversity and metabolite profiles of palm wine produced from three different palm tree species in Côte d'Ivoire. *Sci. Rep.* 10:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58587-2>.
- [61] Santiago-Urbina, J.A., Arias-García, J.A., Ruiz-Terán, F. (2015). Yeast species associated with spontaneous fermentation of taberna, a traditional palm wine from the southeast of Mexico. *Ann. Microbiol.* 65:287–296. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0861-8>.
- [62] Corona-González, R., Ramos-Ibarra, J., Gutiérrez-González, P., Pelayo-Ortiz, C., Guatemala-Morales, G., Arriola-Guevara, E. (2013). The use of response surface methodology to evaluate the fermentation conditions in the production of tepache. *Rev. Mex. Ing. Qum.* 12:19–28.
- [63] Moreno-Terrazas, R., Reyes-Morales, H., Huerta-Ochoa, S., Guerrero-Legarreta, I., Vernon-Carter, E.J. (2001). Note. Consumer awareness of the main sensory attributes of tepache, a traditional fermented fruit beverage. *Food Sci. Technol. Int.* 7:411–415. <https://doi.org/10.1106/BUHF-KMGC-AQ4M-3RXXR>.
- [64] Ojeda-Linares, C.I., Vallejo, M., Lappe-Oliveras, P., Casas, A. (2020). Traditional management of microorganisms in fermented beverages from cactus fruits in Mexico: An ethnobiological approach. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 16:1–12. <https://doi.org/10.1186/s13002-019-0351-y>.
- [65] Kirchmayr, M., Segura, L.E., Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., de la Rosa, M., Gschaedler Mathis, A. (2017). Impact of environmental conditions and process modifications on microbial diversity, fermentation efficiency and chemical profile during the fermentation of Mezcal in Oaxaca. *LWT—Food Sci. Technol.* 79:160–169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.052>.
- [66] Páez-Lerma, J.B., Arias-García, A., Rutiaga-Quiñones, O.M., Barrio, E., Soto-Cruz, N.O. (2013). Yeasts Isolated from the Alcoholic Fermentation of *Agave duranguensis* during

Mezcal Production. Food Biotechnol. 27:342–356.
<https://doi.org/10.1080/08905436.2013.840788>.

- [67] Narváez-Zapata, J.A., Rojas-Herrera, R.A., Rodríguez-Luna, I.C., Larralde-Corona, C.P. (2010). Culture-independent analysis of lactic acid bacteria diversity associated with mezcal fermentation. *Curr. Microbiol.* 61:444–450. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9636-z>.
- [68] Castillo-Morales, M., Wachter-Rodarte, C., Hernández-Sánchez, H. (2005). Preliminary studies on chorote a traditional Mexican fermented product. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21:293–296. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-3634-x>.
- [69] Flynn, K., Villarreal, B.P., Barranco, A., Belc, N., Björnsdóttir, B., Fusco, V., Rainieri, S., Smaradóttir, S.E., Smeu, I., Teixeira, P., Jörundsdóttir, H.O. (2019). An introduction to current food safety needs. *Trends in Food Science & Technology* 84:1–3. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.012>
- [70] Singh, S., Shalini, R. (2016). Effect of Hurdle Technology in Food Preservation: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 56(4):641-9. doi:10.1080/10408398.2012.761594.
- [71] Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., Yi, H. (2020). Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Front Microbiol* 11:582779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- [72] Souza, L.V., Martins, E., Botelho Moreira, I.M.F., de Carvalho, A.F. (2022). Strategies for the development of bioprotective cultures in food preservation. *International Journal of Microbiology.* <https://doi.org/10.1155/2022/6264170>.
- [73] Leyva Salas, M., Thierry, A., Lemaître, M., Garric, G., Harel-Oger, M., Chatel, M., Lê, S., Mounier, J., Valence, F., Coton, E. (2018). Antifungal activity of lactic acid bacteria combinations in dairy mimicking models and their potential as bioprotective cultures in pilot scale applications. *Front. Microbiol.* 9:1787. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01787>.
- [74] Duche, R.T., Singh, A., Wandhare, A.G., Sangwan, V., Sihag, M.K., Nwagu, T.N.T., Panwar, H., Ezeogu, L.I. (2023). Antibiotic resistance in potential probiotic lactic acid

bacteria of fermented foods and human origin from Nigeria. *BMC Microbiol* 23:142. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02883-0>.

- [75] Yap, P.G., Lai, Z.W., Tan, J.S. (2022). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification strategies and applications in food and medical industries: a review. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci* 11, 51. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00227-x>.
- [76] Tack, D., Ray, L., Griffin, P. (2020). Preliminary incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food–foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 2016-2019. *Morbidity Mortality Weekly Report*. 69:509-514. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6917a1>
- [77] Franssen, F., Gerard, C., Cozma-Petruț, A., Vieira-Pinto, M., Jambrak, A.R., Rowan, N., Paulsen, P., Rozycki, M., Tysnes, K., Rodriguez-Lazaro, D., Robertson, L. (2019). Inactivation of parasite transmission stages: Efficacy of treatments on food of animal origin. *Trends in Food Science and Technology* 83:114-128. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.009>.
- [78] Patrovsky, M., Kourimska, L., Havlikova, S., Markova, J., Pechar, R., Rada, V. (2016). Utilization of bacteriocin-producing bacteria in dairy products. *Mljekarstvo*. 66:215-224. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2016.0306>.
- [79] Bockelmann, W., Koslowsky, M., Goerges, S., Scherer, S., Franz, C., Heller, K.J. (2017). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Staphylococcus equorum* SE3 in cheese models. *Food Control*. 71:50-56. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.019>.
- [80] Khan, I., Oh, D.H. (2016). Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 34:376-384. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.12.013>.
- [81] Tirloni, E., Bernardi, C., Ghelardi, E., Celandroni, F., Andrighetto, C., Rota, N., Stella, S. (2020). Biopreservation as a potential hurdle for *Bacillus cereus* growth in fresh cheese. *Journal of Dairy Science* 103:150–160. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16739>.

- [82] Ribeiro, S.C., Ross, R.P., Stanton, C., Silva, C.C. (2017). Characterization and application of antilisterial enterocins on model fresh cheese. *J Food Prot* 80:1303–1316. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-031>.
- [83] Aspri, M., Oconnor, P.M., Field, D., Cotter, P.D., Ross, P., Hill, C. (2017). Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *Journal of International Dairy Research* 73:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.04.008>
- [84] Khay, E., Idaomar, M., El Moussaoui, N., Abrini, J. (2014) Application of a bacteriocin-like inhibitory substance producing *Enterococcus durans* E204 strain, isolated from camel milk, to control *Listeria monocytogenes* CECT 4032 in goat jben. *Ann Microbiol* 64:313–319. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0666-1>.
- [85] Benkerroum, N., Ghouati, Y., Ghalfi, H., Elmejdoub, T., Roblain, D., Jacques, P., Thonart, P. (2002). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in a model cultured milk (lben) by *in situ* bacteriocin production from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Int J Dairy Technol* 55:145–151. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2002.00053.x>.
- [86] Vandera, E., Lianou, A., Kakouri, A., Feng, J., Koukkou, A.I., Samelis, J. (2017). Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus faecium* KE82, a multiple enterocin-producing strain, in different milk environments. *Journal of Food Proteins* 80:74-85. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-082>.
- [87] Yildirim, Z., Öncül, N., Yildirim, M., Karabiyikli, Ş. (2016). Application of lactococcin BZ and enterocin KP against *Listeria monocytogenes* in milk as biopreservation agents. *Acta Aliment.* 45, 486–492. <https://doi.org/10.1556/066.2016.45.4.4>.
- [88] Shi, F., Wang, Y.W., Li, Y.F., Wang, X.Y. (2016). Mode of action of leucocin K7 produced by *Leuconostoc mesenteroides* K7 against *Listeria monocytogenes* and its potential in milk preservation. *Biotechnol Lett.* 38:1551–1557. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2127-y>.
- [89] Suda, S., Cotter, P.D., Hill, C., Paul, R.R. (2012). Lacticin 3147-biosynthesis, molecular analysis, immunity, bioengineering and applications. *Current Protein & Peptide Science* 13:193-204. <https://doi.org/10.2174/138920312800785021>.

- [90] Simha, B.V., Sood, S., Kumariya, R., Garsa, A.K. (2012). Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. *Microbiological Research*. 167:544-549. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.01.001>.
- [91] Morandi, S., Silveti, T., Battelli, G., Brasca, M. (2019). Can lactic acid bacteria be an efficient tool for controlling *Listeria monocytogenes* contamination on cheese surface? The case of Gorgonzola cheese. *Food Control* 96:499–507. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.10.012>.
- [92] Motalebi Moghanjoughi, Z., Rezazadeh Bari, M., Alizadeh Khaledabad, M., Almasi, H., Amiri, S. (2020). Bio-preservation of white brined cheese (Feta) by using probiotic bacteria immobilized in bacterial cellulose: optimization by response surface method and characterization. *LWT - Food Science and Technology* 117. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108603>.
- [93] Ouiddir, M., Bettache, G., Leyva Salas, M., Pawtowski, A., Donot, C., Brahimi, S., Mabrouk, K., Coton, E., Mounier, J. (2019). Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products. *Food Microbiology*. 82:160–170. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.020>
- [94] Mieszkin, S., Hymery, N., Debaets, S., Cotón, E., Le Blay, G., Valencia, F., Mounier, J. (2017). Action mechanisms involved in the bioprotective effect of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1.Np against *Yarrowia lipolytica* in fermented milk. *International Journal of Food Microbiology* 248:47–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.0>.
- [95] Ramaroson, M., Guillou, S., Rossero, A., Rezé, S., Anthoine, V., Moriceau, N., Martin, J.L., Durantou, F., Zagorec, M. (2018). Selection procedure of bioprotective cultures for their combined use with High Pressure Processing to control spore-forming bacteria in cooked ham. *International Journal of Food Microbiology*. 276:28–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.010>.
- [96] Castilho, N.P.A.d., Todorov, S.D., Oliveira, L.L., Bersot, L.d.S., Nero, L.A. (2020). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fresh sausage by bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* UFV-NPAC1 and its semi-purified bacteriocin. *LWT - Food Science and Technology*. 18. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108757>

- [97] Giello, M., La Stora, A., De Filippis, F., Ercolini, D., Villani, F. (2018). Impact of *Lactobacillus curvatus* 54M16 on microbiota composition and growth of *Listeria monocytogenes* in fermented sausage. *Food Microbiology*. 72:1–15. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.003>.
- [98] Ben Braïek, O., Smaoui, S., Ennouri, K., Morandi, S., Cremonesi, P., Hani, K., Ghrairi, T. (2018). RAPD-PCR characterisation of two *Enterococcus lactis* strains and their potential on *Listeria monocytogenes* growth behaviour in stored chicken breast meats: Generalised linear mixed-effects approaches. *LWT-Food Sci Technol*. 99:244–253. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.053>.
- [99] İncili, G.K., Karatepe, P., İlhak, O.İ. (2020). Effect of chitosan and *Pediococcus acidilactici* on *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in meatballs. *LWT - Food Science and Technology* 117:108706. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108706>.
- [100] Osés, S.M., Diez, A.M., Gómez, E.M., Wilches-Pérez, D., Luning, P.A., Jaime, I., Rovira, J. (2015). Control of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in suckling-lamb meat evaluated using microbial challenge tests. *Meat Science*. 110:262–269. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.08.004>.
- [101] Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Mortazavi, S.A., Abedfar, A. (2019). Application of the selected antifungal LAB isolate as a protective starter culture in pan whole-wheat sourdough bread. *Food Control*. 95:298–307. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.013>.
- [102] Facco Stefanello, R., Nabeshima, E.H., de Oliveira Garcia, A., Heck, R.T., Valle Garcia, M., Martins Fries, L.L., Venturini Copetti, M. (2019). Stability, sensory attributes and acceptance of panettones elaborated with *Lactobacillus fermentum* IAL 4541 and *Wickerhamomyces anomallus* IAL 4533. *Food Research International*. 116:973–984. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.035>.
- [103] Mantzourani, I., Plessas, S., Odatzidou, M., Alexopoulos, A., Galanis, A., Bezirtzoglou, E., Bekatorou, A. (2019). Effect of a novel *Lactobacillus paracasei* starter on sourdough bread quality. *Food Chemistry*. 271:259–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.183>.

- [104] Le Lay, C., Mounier, J., Vasseur, V., Weill, A., Le Blay, G., Barbier, G., Coton, E. (2016). *In vitro* and *in situ* screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. *Food Control*. 60: 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.034>.
- [105] Lavermicocca, P, Angiolillo, L., Lonigro, S.L., Valerio, F., Bevilacqua, A., Perricone, M., Del Nobile, M.A., Corbo, M.R., Conte, A. (2018). *Lactobacillus plantarum* 5BG survives during refrigerated storage bio-preserving packaged Spanish-style table olives (cv. Bella di Cerignola). *Frontiers in Microbiology*. 9:889–910. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00889>.
- [106] Dong, Q., Zhang, W., Guo, L., Niu, H., Liu, Q., Wang, X. (2020). Influence of *Lactobacillus plantarum* individually and in combination with low O₂-MAP on the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* in cabbage. *Food Control*. 107. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106765>.
- [107] Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D.I., Tabanelli, G., Montanari, C., Gardini, F., Lanciotti, R. (2015). Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. *Food Microbiology*. 47:74–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.008>.
- [108] Trias, R., Badosa, E., Montesinos, E., Bañeras, L. (2008). Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. *International Journal of Food Microbiology*. 127:91–98. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.011>.
- [109] Rao, Y., Tao, Y., Li, Y., She, X., Yang, J., Qian, Y., Du, H., Liu, L., Xiao, H. (2019). Characterization of a probiotic starter culture with anti-Candida activity for Chinese pickle fermentation. *Food & Function*. 10:6936–6944. <https://doi.org/10.1039/C9FO01191A>.
- [110] Ma, J., Hong, Y., Deng, L., Yi, L., Zeng, K. (2019). Screening and characterization of lactic acid bacteria with antifungal activity against *Penicillium digitatum* on citrus. *Biological Control*. 138. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104044>.
- [111] Taroub, B., Salma, L., Manel, Z., Ouzari, H.I., Hamdi, Z., Moktar, H. (2019). Isolation of lactic acid bacteria from grape fruit: antifungal activities, probiotic properties, and *in vitro*

detoxification of ochratoxin A. *Annals of Microbiology*. 69: 17–27. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1359-6>.

- [112] Aymerich, T., Rodríguez, M., Garriga, M., Bover-Cid, S. (2019). Assessment of the bioprotective potential of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 8 ° C. *Food Microbiology*. 83:64–70. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.011>.
- [113] Kaktcham, P.M., Tchamani Piame, L., Sandjong Sileu, G.M., Foko Kouam, E.M., Temgoua, J.B., Zambou Ngoufack, F., Pérez-Chabela M.d.L. (2019). Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3MT isolated from freshwater Nile Tilapia: isolation, safety traits, bacteriocin characterisation, and application for biopreservation in fish pâté. *Archives of Microbiology*. 201:1249–1258. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01690-4>.
- [114] Danza, A., Lucera, A., Lavermicocca, P., Lonigro, S.L., Bavaro, A.R., Mentana, A., Centonze, D., Conte, A., Del Nobile, M.A. (2018). Tuna burgers preserved by the selected *Lactobacillus paracasei* IMPC 4.1 strain. *Food and Bioprocess Technology*. 11:1651–1661. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2129-y>.
- [115] Oberman, H., Libudzisz, Z. (1998). Fermented milks. In: Wood, B.J.B. (eds) *Microbiology of Fermented Foods*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-03091_11.
- [116] Gasbarrini, G., Bonvicini, F., Gramenzi, A. (2016). Probiotics History. *J Clin Gastroenterol*. 50 Suppl 2. Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015:S116-S119. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000697>.
- [117] FAO, OMS. (2002). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Estud FAO Aliment y Nutr*. 85.
- [118] Mizock BA. Probiotics. *Dis Mon*. 2015 Jul;61(7):259-90. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2015.03.011>.
- [119] Byakika, S., Mukisa, I.M., Byaruhanga, Y.B., Muyanja, C.A. (2019). Review of criteria and methods for evaluating the probiotic potential of microorganisms. *Food Rev. Int*. Taylor and Francis Inc. (5), 427–466. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1584815>.

- [120] Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M.E., Tremblay, A., Ouwehand, A.C. (2020). Criteria to qualify microorganisms as “Probiotic” in foods and dietary supplements. *Front. In Microbiol.* 11:1662. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>
- [121] de Melo Pereira, G.V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A.I., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C.R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol Adv.* 36(8):2060-2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>.
- [122] Pushkaran, A.C., Nataraj, N., Nair, N., Götz, F., Biswas, R., Mohan, C.G. (2015) Understanding the structure-function relationship of lysozyme resistance in *Staphylococcus aureus* by peptidoglycan O-Acetylation using molecular docking, dynamics, and lysis assay. *J Chem Inf Model.* 27;55(4):760-70. <https://doi.org/10.1021/ci500734k>.
- [123] Koll, P., Mändar, R., Marcotte, H., Leibur, E., Mikelsaar, M., Hammarström, L. (2008). Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiol Immunol.* 23:139–147. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00402.x>.
- [124] Solieri, L., Bianchi, A., Mottolèse, G., Lemmetti, F., Giudici, P. (2014). Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. *Food Microbiol.* 38:240–249. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.003>.
- [125] Zago, M., Fornasari, M.E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J., Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* 28:1033–1040. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.009>.
- [126] Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gil, A. (2014). Sources, isolation, characterization and evaluation of probiotics. *Br J Nutr.* 109 Suppl 2:S35-50. <https://doi.org/10.1017/S0007114512004011>.
- [127] Vinderola, G., Gueimonde, M., Gomez-Gallego, C. (2017). Correlation between *in vitro* and *in vivo* assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. *Trends Food Sci Technol.* 68:83–90. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.005>

- [128] Dunne, W.M. Jr. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev.* 15(2):155-66. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002>.
- [129] Cheng, K., Mcallister, T.A., Costerton, J.W. (1995). Biofilms of the ruminant digestive tract. In: Lappin-Scott HM, Costerton JW, editors. *Microbial biofilms*. 1st ed. New York, New York: Cambridge University Press. p. 221–32.
- [130] Śliżewska, K., Chlebicz-Wójcik, A., Nowak, A. (2021). Probiotic properties of new *Lactobacillus* strains intended to be used as feed additives for monogastric animals. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 13 146–162. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09674-3>.
- [131] Kang, C.H., Kim, Y.G., Hwa Han, S., Kim, J.S., Paek, N.S., So, J.S. (2018). *In vitro* probiotic properties of vaginal *Lactobacillus fermentum* MG901 and *Lactobacillus plantarum* MG989 against *Candida albicans*. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 228 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2018.07.005>.
- [132] Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev.* 72(4):728-64. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00017-08>.
- [133] da Silva Ferrari, I., de Souza, J.V., Ramos, C.L., da Costa, M.M., Schwan, R.F., Dias, F.S. (2016). Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella* Typhi in artisanal cheese. *Food Microbiology*. 60:29–38. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.014>.
- [134] Zuo, F., Yu, R., Feng, X., Chen, L., Zeng, Z., Bahar Khaskheli, G., Ma, H., Chen, S. (2015). Characterization and *in vitro* properties of potential probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-fed infant feces. *Annals of Microbiology*. 66 1027–1037. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1187-x>.
- [135] Zawistowska-Rojek, A., Zaręba, T., Tyski, S. (2022). Microbiological testing of probiotic preparations. *Int J Environ Res Public Health*. 7;19(9):5701. <https://doi.org/10.3390/ijerph19095701>.

- [136] Kumar, M., Nagpal, R., Verma, V., Kumar, A., Kaur, N., Hemalatha, R., Gautam, S.K., Singh, B. (2013). Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutr Rev.* 71(1):23-34. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00542.x>.
- [137] Commane, D., Hughes, R., Shortt, C., Rowland, I. (2005). The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutat Res.* 11;591(1-2):276-89. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.02.027>.
- [138] Dos Reis, S.A., da Conceição, L.L., Siquiera, N.P., Rosa, D.D., da Silva, L.L., Peluzio, M.D. (2017). Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutr Res.* 37:1-19. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.11.009>.
- [139] Ooi, L.G., Liong, M.T. (2010). Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings. *Int J Mol Sci.* 17;11(6):2499-522. <https://doi.org/10.3390/ijms11062499>.
- [140] Nguyen, T.D., Kang, J.H., Lee, M.S. (2007). Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int J Food Microbiol.* 15;113(3):358-61. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.015.
- [141] Tannock, G.W., Savage, D.C. (1974). Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. *Infect Immun.* 9(3):591-8. <https://doi.org/10.1128/iai.9.3.591-598.1974>.
- [142] Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Bienenstock, J., Dinan, T.G. (2008). The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res.* 43(2):164-74. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2008.03.009>.
- [143] Kerry, R.G., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.S., Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *J Food Drug Anal.* 26(3):927-939. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>.
- [144] Sáez-Lara, M.J., Robles-Sanchez, C., Ruiz-Ojeda, F.J., Plaza-Diaz, J., Gil, A. (2016). Effects of probiotics and synbiotics on obesity, insulin resistance syndrome, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: A review of human clinical trials. *Int J Mol Sci.* 13;17(6):928. <https://doi.org/10.3390/ijms17060928>.

- [145] Rocha-Ramírez, L.M., Pérez-Solano, R.A., Castañón-Alonso, S.L., Moreno Guerrero, S.S., Ramírez Pacheco, A., García Garibay, M., Eslava, C. (2017). Probiotic *Lactobacillus* strains stimulate the inflammatory response and activate human macrophages. *J Immunol Res.* 4607491. <https://doi.org/10.1155/2017/4607491>.
- [146] Stefanovic, E., Kilcawley, K.N., Rea, M.C., Fitzgerald, G.F., McAuliffe, O. (2017). Genetic, enzymatic and metabolite profiling of the *Lactobacillus casei* group reveals strain biodiversity and potential applications for flavour diversification. *J Appl Microbiol.* 122(5):1245-1261. <https://doi.org/10.1111/jam.13420>.
- [147] Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., de Vos, W. M. (2005). Probiotic and other functional microbes: From Markets to Mechanisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.003>.
- [148] Nangia, T., Setia, V., Kochhar, G. K., Kaur, K., Bansal, R., Sharma, R. (2014). Probiotics: Review of literature. *J. Period. Med. Clin. Pract.* 1, 144–151.
- [149] Byakika, S., Mukisa, I.M., Byaruhanga, Y.B., Muyanja, C. (2019). A review of criteria and methods for evaluating the probiotic potential of microorganisms. *Food Rev. Int.* 35:427–466. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1584815>.
- [150] Gonçalves de Lima, O. (1956). *El maguey y el pulque en los Códices Mexicanos*. México, DF: Fondo de Cultura Económica.
- [151] Valdivieso Solís, D.G., Vargas Escamilla, C.A., Mondragón Contreras, N., Galván Valle, G.A., Gilés-Gómez, M., Bolívar, F., Escalante, A. (2021). Sustainable production of pulque and maguey in Mexico: Current situation and perspectives. *Front. Sustain. Food Syst.* 5:678168. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.678168>
- [152] Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2020). Avance de siembras y cosechas. Resumen nacional por cultivo. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do.
- [153] Ramírez-Manzano, S.I., Bye, R., García-Moya, E., Romero-Manzanares, A. (2020). Aprovechamiento del Maguey pulquero en Nanacamilpa, Tlaxcala, México, *Revista Etnobiología.* 18:65–76.

- [154] Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2021). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Available online at: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- [155] Sánchez-Marroquín, A., Hope, P.H. (1953). Agave juice, fermentation and chemical composition studies of some species. *J. Agric. Food Chem.* 1, 246–249. <https://doi.org/10.1021/jf60003a007>.
- [156] Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Res.* 8(7):1037–52. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x>.
- [157] Sánchez-Marroquín, A., Terán, J., Piso, J. (1957). Estudios sobre la microbiología del pulque. -XVIII.- Datos químicos de la fermentación de aguamiel con cultivos puros. *Rev. Soc. Quím. México* 1, 167–174.
- [158] Escalante, A., Elena Rodríguez, M., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 235(2):273–9. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.04.045>.
- [159] Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M.S., López-Munguía, A., Gosset, G., Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int J Food Microbiol.* 124(2):126–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>.
- [160] Anderson, R.K., Calvo, J., Serrano, G., Payne, G.C. (1944). A study of the nutritional status and food habits of Otomi Indians in the Mezquital Valley of Mexico. 36.
- [161] Backstrand, J. R., Allen, L. H., Black, A. K., de Mata, M., Pelto, G. H. (2002). Diet and iron status of nonpregnant women in rural Central Mexico. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 156–164.
- [162] Backstrand, J.R., Allen, L.H., Martinez, E., Pelto, G. H. (2001). Maternal consumption of pulque, a traditional central Mexican alcoholic beverage: relationships to infant growth and development. *Public Health Nutr.* 4, 883–891. <https://doi.org/10.1079/PHN2001130>

- [163] Backstrand, J.R., Goodman, A.H., Allen, L.H., Pelto, G.H. (2004). Pulque intake during pregnancy and lactation in rural Mexico: alcohol and child growth from 1 to 57 months. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 1626–1634. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602019>.
- [164] Tripathi, M.K., Giri, S.K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J. Funct. Foods.* 9, 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>.
- [165] Soccol, C.R., De Dea, J., Tiemi, C., Rigan, M., Porto de Souza, L., Soccol, T. (2012). Probiotic nondairy beverages, in *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology*, ed Hui Y. H. (Boca Raton, FL: CRC Press). 707–728.
- [166] González-Vázquez, R., Azaola-Espinosa, A., Mayorga-Reyes, L., Reyes-Nava, L.A., Shah, N.P., Rivera-Espinoza, Y. (2015). Isolation, identification and partial characterization of a *Lactobacillus casei* strain with bile salt hydrolase activity from pulque. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 7, 242–248. <https://doi.org/10.1007/s12602-015-9202-x>.
- [167] Reyes-Naya, L., Garduño-Siciliano, L., Santos, E., Hernández-Sánchez, H.A., Arauz, J., Muriel, P., Rivera-Espinoza, Y. (2016). Use of bile acids as a selection strategy for lactobacillus strains with probiotic potential. *J. Food Nutr. Disord.* 5:1. <https://doi.org/10.4172/2324-9323.1000187>.
- [168] Escobar-Sánchez, M., Carrasco-Navarro, U., Juárez-Castelán, C., Lozano-Aguirre Beltrán, L., Pérez-Chabela, M.L., Ponce-Alquicira, E. (2023). Probiotic Properties and Proteomic Analysis of *Pediococcus pentosaceus* 1101. *Foods* 2023. 12, 46. <https://doi.org/10.3390/foods12010046>
- [169] Kumari, V.B.C., Huligere, S.S., Ramu, R., Naik Bajpe, S., Sreenivasa, M.Y., Silina, E., Stupin, V., Achar, R.R. (2022). Evaluation of probiotic and antidiabetic attributes of *Lactobacillus* Strains isolated from fermented beetroot. *Frontiers in Microbiology.* 13:911243. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.911243>.
- [170] Zhang, W., Lai, S., Zhou, Z., Yang, J., Liu, H., Zhong, Z., Fu, H., Ren, Z., Shen, L., Cao, S., Deng, L., Peng, G. (2022). Screening and evaluation of lactic acid bacteria with probiotic potential from local Holstein raw milk. *Frontiers in Microbiology.* 13:918774. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.918774>.

- [171] Zhou, Y., Gong, W., Xu, C., Zhu, Z., Peng, Y., Xie, C. (2022). Probiotic assessment and antioxidant characterization of *Lactobacillus plantarum* GXL94 isolated from fermented chili. *Frontiers in Microbiology*. 13:997940. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.997940>.
- [172] Zheng, Y., Lu, Y., Wang, J., Yang, L., Pan, C., Huang, Y. (2013). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan Kefir grains. *PLoS ONE*. 8(7): e69868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069868>
- [173] Colombo, M., Nero, L.A., Todorov, S.D. (2020). Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems. *Brazilian Journal of Microbiology*. 51 787–795. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00227-y>
- [174] Sakandar, H.A., Usman, K., Imran, M. (2018). Isolation and characterization of glutendegrading *Enterococcus mundtii* and *Wickerhamomyces anomalus*, potential probiotic strains from indigenously fermented sourdough (Khamir). *LWT-Food Sci and Technol*. 91, 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.023>.
- [175] Boyle-Vavra, S., Daum, R.S. (2010). Reliability of the BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) assay in detecting MRSA isolates with a variety of genotypes from the United States and Taiwan. *J Clin Microbiol*. 48(12):4546-51. <https://doi.org/10.1128/JCM.02519-09>.
- [176] Touret, T., Oliveira, M., Semedo-Lemsaddek, T. (2018). Putative probiotic lactic acid bacteria isolated from sauerkraut fermentations. *PLoS One*. 13 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203501>.
- [177] Rezaei, M., Noori, N., Shariatifar, N., Gandomi, H., Akhondzadeh Basti, A., Mousavi Khaneghah, A. (2020). Isolation of lactic acid probiotic strains from Iranian camel milk: Technological and antioxidant properties. *Lwt - Food Sci and Technol*. 132 109823. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109823>.
- [178] Kaur, M., Singh, H., Jangra, M., Kaur, L., Jaswal, P., Dureja, C., Nandanwar, H., Chaudhuri, S.R., Raje, M., Mishra, S., Kumar Pinnaka, A. (2017). Lactic acid bacteria isolated from yak milk show probiotic potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101 7635–7652. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8473-4>.

- [179] Gheytañchi, E., Heshmati, F., Kordestani Shargh, B., Nowroozi, J., Movahedzadeh, F. (2010). Study on β -galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. *African Journal of Microbiology Research*. 4 454–458.
- [180] Das, P., Khowala, S., Biswas, S. (2016). *In vitro* probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples. *LWT - Food Sci and Technol*. 73 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.029>.
- [181] Rocha-Arriaga, C., Espinal-Centeno, A., Martínez-Sánchez, S., Caballero-Pérez, J., Alcaraz, L.D., Cruz-Ramírez, A. (2020). Deep microbial community profiling along the fermentation process of pulque, a biocultural resource of Mexico. *Microbiological Research*. 241 126593. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126593>.
- [182] Fijan S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int J Environ Res Public Health*. 5;11(5):4745-67. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504745>.
- [183] Vivek, K., Mishra, S., Pradhan, R. C., Nagarajan, M., Kumar, P. K., Singh, S. S., Manvi, D., Gowda, N. N. (2023). A comprehensive review on microencapsulation of probiotics: Technology, carriers and current trends. *Applied Food Research*. 3(1), Article 100248. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100248>.
- [184] Ahn, Y.T., Kim, G.B., Lim, K.S., Baek, Y.J., Kim, H.U. (2003). Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *International Dairy Journal*. 13 303–311. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00174-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00174-7).
- [185] Li, C.; Ji, Q.; Liu, Y.; Ma, Y. (2020). Characterization of a Recombinant Bile Salt Hydrolase (BSH) from *Bifidobacterium Bifidum* for Its Glycine-Conjugated Bile Salts Specificity. *Biocatal. Biotransform.* 1–10. <https://doi.org/10.1080/10242422.2020.1804881>.
- [186] Sharma, P., Tomar, S., Sangwan, V., Goswami, P., Singh, R. (2015). Antibiotic resistance of *Lactobacillus* sp. Isolated from commercial probiotic preparations. *J Food Saf.* 36:38–51. <https://doi.org/10.1111/jfs.12211>.
- [187] Hernández, A., Sánchez, M.B., Martínez, J.L. (2011). Quinolone resistance: much more than predicted. *Front Microbiol.* 2:22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00022>.

- [188] Jiang, X., Yu, T., Zhou, D., Ji, S., Zhou, C., Shi, L., Wang, X. (2016). Characterization of quinolone resistance mechanisms in lactic acid bacteria isolated from yogurts in China. *Ann Microbiol.* 66:1249–1256. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1214-6>.
- [189] Waters, C.M., Dunny, G.M. (2001). Analysis of functional domains of the *Enterococcus faecalis* pheromone-induced surface protein aggregation substance. *J Bacteriol.* 183(19):5659-67. <https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5659-5667.2001>.
- [190] Sakandar H.A., Kubow S., Sadiq F.A. (2019). Isolation and *in vitro* probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from chinese fruits and flowers. *LWT.* 104:70–75. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.038>.
- [191] Munir, A., Javed, G. A., Javed, S., and Arshad, N. (2022). *Levilactobacillus brevis* from carnivores can ameliorate hypercholesterolemia: *in vitro* and *in vivo* mechanistic evidence. *J. Appl. Microbiol.* 133, 1725–1742. <https://doi.org/10.1111/jam.15678>.

11. ANEXOS

A.1. Capacidad de autoagregación (%) a las 2, 4, 6, 20 y 24 h de las bacterias lácticas del pulque y del control *Lactobacillus acidophilus* NCFM.

Cepa	Tiempo (h)				
	2	4	6	20	24
<i>Lact. paracasei</i> RVG1	2.6 ± 0.6	15.3 ± 0.1	16.2 ± 0.1	16.8 ± 0.3	17.0 ± 0.3
<i>Lact. plantarum</i> RVG2	4.3 ± 0.0	14.4 ± 0.3	11.7 ± 0.0	25.9 ± 0.1	27.0 ± 0.1
<i>Lact. plantarum</i> RVG4	3.4 ± 0.0	6.8 ± 0.1	8.2 ± 0.1	17.0 ± 0.2	21.9 ± 0.2
<i>Lact. plantarum</i> UTMB1	2.6 ± 0.4	3.1 ± 0.1	4.1 ± 0.0	11.7 ± 0.1	15.8 ± 0.3
<i>Lact. brevis</i> UTMB2	3.9 ± 1.0	14.5 ± 0.8	30.9 ± 0.2	32.0 ± 0.2	34.3 ± 0.5
<i>Lact. paracasei</i> UTMB4	3.6 ± 1.0	10.5 ± 0.1	12.8 ± 0.0	15.9 ± 0.1	20.3 ± 0.1
<i>Lact. paracasei</i> UTMB7	2.1 ± 0.4	9.7 ± 0.1	16.6 ± 0.1	18.6 ± 0.1	19.5 ± 0.0
NCFM	1.7 ± 0.1	27.1 ± 0.0	39.2 ± 0.1	87.6 ± 0.3	94.1 ± 0.1

A.2. Capacidad de coagregación (%) con EPEC, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* a las 2, 4, 6, 20 y 24 h de bacterias lácticas del pulque y el control *Lactobacillus acidophilus* NCFM.
Escherichia coli (EPEC) 2348/69

Cepa	Tiempo (h)				
	2	4	6	20	24
<i>Lact. paracasei</i> RVG1	38.4 ± 0.4	41.7 ± 0.1	44.7 ± 0.0	54.9 ± 0.1	58.6 ± 0.1
<i>Lact. plantarum</i> RVG2	39.4 ± 0.3	45.1 ± 0.1	48.1 ± 0.1	63.8 ± 0.1	64.9 ± 0.1
<i>Lact. plantarum</i> RVG4	41.8 ± 0.4	45.9 ± 0.1	49.5 ± 0.0	59.5 ± 0.1	61.4 ± 0.1
<i>Lact. plantarum</i> UTMB1	41.3 ± 0.1	44.1 ± 0.1	46.8 ± 0.1	61.3 ± 0.1	62.3 ± 0.1
<i>Lact. brevis</i> UTMB2	37.9 ± 0.2	40.3 ± 0.1	45.3 ± 0.1	58.1 ± 0.1	59.5 ± 0.1
<i>Lact. paracasei</i> UTMB4	40.6 ± 0.4	42.3 ± 0.1	45.5 ± 0.1	63.0 ± 0.1	64.4 ± 0.1
<i>Lact. paracasei</i> UTMB7	40.9 ± 0.4	44.7 ± 0.1	49.2 ± 0.0	60.3 ± 0.0	62.2 ± 0.1
NCFM	43.3 ± 0.3	48.6 ± 0.1	54.1 ± 0.1	63.7 ± 0.1	64.1 ± 0.0

Listeria monocytogenes LM-W207

Cepa	Tiempo (h)				
	2	4	6	20	24
<i>Lact. paracasei</i> RVG1	61.6 ± 0.1	66.3 ± 0.3	65.9 ± 0.1	82.3 ± 1.2	83.7 ± 0.5
<i>Lact. plantarum</i> RVG2	61.9 ± 0.1	68.9 ± 0.0	69.8 ± 0.1	85.8 ± 0.0	85.8 ± 0.2
<i>Lact. plantarum</i> RVG4	59.6 ± 0.8	66.3 ± 0.8	67.7 ± 0.3	85.6 ± 0.8	85.3 ± 0.3
<i>Lact. plantarum</i> UTMB1	60.0 ± 0.6	63.3 ± 0.0	65.3 ± 0.8	81.6 ± 0.1	83.6 ± 0.1
<i>Lact. brevis</i> UTMB2	59.9 ± 0.1	64.0 ± 0.2	65.3 ± 0.5	83.7 ± 0.4	83.8 ± 0.3
<i>Lact. paracasei</i> UTMB4	61.4 ± 0.4	64.7 ± 0.4	66.4 ± 0.3	85.6 ± 0.5	86.5 ± 0.0
<i>Lact. paracasei</i> UTMB7	59.3 ± 0.6	66.7 ± 0.6	68.8 ± 0.3	84.8 ± 0.6	84.7 ± 0.0
NCFM	61.7 ± 0.5	70.2 ± 0.4	72.4 ± 0.3	87.2 ± 0.3	87.6 ± 0.4

Salmonella enterica serovar Typhi ATCC 9992

Cepa	Tiempo (h)				
	2	4	6	20	24
<i>Lact. paracasei</i> RVG1	60. ± 0.5	65.2 ± 0.1	66.8 ± 0.5	85.9 ± 1.1	87.3 ± 0.4
<i>Lact. plantarum</i> RVG2	64.7 ± 0.4	66.6 ± 0.5	76.2 ± 0.3	83.4 ± 0.3	83.6 ± 0.2
<i>Lact. plantarum</i> RVG4	59.9 ± 0.4	64.2 ± 0.6	73.2 ± 0.3	85.5 ± 0.1	86.5 ± 0.2
<i>Lact. plantarum</i> UTMB1	62.3 ± 0.1	62.8 ± 0.0	64.5 ± 0.5	83.1 ± 0.1	83.4 ± 0.1
<i>Lact. brevis</i> UTMB2	58.8 ± 0.9	63.2 ± 0.1	71.3 ± 0.2	85.1 ± 0.1	85.4 ± 0.1
<i>Lact. paracasei</i> UTMB4	63.0 ± 0.3	66.8 ± 0.1	70.8 ± 0.8	84.2 ± 0.1	85.9 ± 0.2
<i>Lact. paracasei</i> UTMB7	59.5 ± 0.6	63.5 ± 0.4	66.4 ± 1.3	83.7 ± 0.7	84.7 ± 0.3
NCFM	62.7 ± 1.1	70.2 ± 0.1	75.1 ± 0.9	87.2 ± 0.2	88.2 ± 0.4

12. PRODUCTOS GENERADOS

1. Artículo de divulgación en la Revista de Divulgación Científica iBIO: **“El pulque: un regalo de los dioses”**
2. Capítulo de Libro: **“Antimicrobial peptides from lactic acid bacteria as a hurdle technology component for food preservation: applications and safety considerations”** en el libro de SpringerNature: **“Antimicrobial peptides from lactic acid bacteria: Diversity, Biosynthesis and Applications”**.
3. Artículo científico publicado en la revista Frontiers in Microbiology: **“Probiotic and functional potential of lactic acid bacteria isolated from pulque and evaluation of their safety for food applications”**.
4. XXIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, XII Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, XIX Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. Presentación oral: **Caracterización del potencial probiótico y funcional de bacterias ácido lácticas aisladas del pulque.**
5. Seminario de investigación impartido en la Universidad Tecnológica de la Mixteca a los investigadores y alumnos de la Maestría en Ciencias: Productos Naturales y alimentos: **Caracterización del potencial probiótico y funcional de bacterias ácido lácticas aisladas del pulque.**

El Pulque: un regalo de los Dioses

Concepción Calderón García
Edith Ponce Alquicira
Yesica Ruiz Ramírez

Resumen

El pulque es una bebida alcohólica producto de la fermentación del aguamiel que se obtiene de diversas especies de agave. Históricamente, esta bebida se consideraba un regalo de los Dioses, principalmente por la alegría que provocaba después de consumirlo y por los beneficios que podían percibir. En la actualidad, algunos beneficios del pulque han sido asociados a su gran diversidad de microorganismos, principalmente bacterias. En este texto abordamos algunas cuestiones históricas, el proceso de producción, y los beneficios del pulque.

Palabras clave: Pulque, fermentación, probióticos.

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina, 09340, Iztapalapa, Ciudad de México, México.

**Autor para la correspondencia:
ruiz1706@xanum.uam.mx*

2.

Asunto Acceptance notice: LAB Book Chapter Springer
De Subhasree Ray <lab.springernature@gmail.com>
Destinatario Rvaladez <rvaladez@mixteco.utm.mx>
Fecha 2023-11-21 21:58

Dear Dr. Rogelio Valadez Blanco,
Thank you so much for the revised version of your book chapter.

We wish to inform you that the chapter entitled "**Antimicrobial peptides from lactic acid bacteria as a hurdle technology component for food preservation: applications and safety considerations**" authored by Yesica Ruiz-Ramírez, Paula Cecilia Guadarrama-Mendoza, Rogelio Valadez-Blanco*, Edith Ponce-Alquicira* has been accepted for publication after peer-review of the manuscript.

The book chapter will be published in SpringerNature book "**Antimicrobial peptides from lactic acid bacteria: Diversity, Biosynthesis and Applications**" being edited by me and other co-editors.

We thank you once again for your valuable contribution to our book project.

We hope to work with you in the future.

Regards
Subhasree Ray (Editor)
SSBSR, Sharda University, Greater Noida, India
Email: subhasree.ray@sharda.ac.in



OPEN ACCESS

EDITED BY
Jesús Bernardo Pérez Lerma,
TECNM/I. T. DURANGO, MexicoREVIEWED BY
Corina-Diana Ceapa,
National Autonomous University of Mexico,
Mexico
Juan A. Rojas-Contreras,
Durango Institute of Technology, Mexico
Perla Guadalupe Vázquez Ortega,
Durango Institute of Technology, Mexico*CORRESPONDENCE
Edith Ponce-Alquicira
✉ pae@xanum.uam.mxRECEIVED 16 June 2023
ACCEPTED 22 August 2023
PUBLISHED 12 September 2023CITATION
Ruiz-Ramírez Y, Valadez-Blanco R,
Calderón-García C, Chikindas ML and
Ponce-Alquicira E (2023) Probiotic and
functional potential of lactic acid bacteria
isolated from pulque and evaluation of their
safety for food applications.
Front. Microbiol. 14:1241581.
doi: 10.3389/fmicb.2023.1241581COPYRIGHT
© 2023 Ruiz-Ramírez, Valadez-Blanco,
Calderón-García, Chikindas and Ponce-
Alquicira. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The
use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in this
journal is cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Probiotic and functional potential of lactic acid bacteria isolated from pulque and evaluation of their safety for food applications

Yesica Ruiz-Ramírez¹, Rogelio Valadez-Blanco²,
Concepción Calderón-García², Michael Leonidas
Chikindas^{3,4,5} and Edith Ponce-Alquicira^{1*}¹Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Iztapalapa, Mexico, ²Instituto de Agroindustrias, Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, Mexico, ³Health Promoting Natural Laboratory, School of Environmental and Biological Sciences, Rutgers, The State University of New Jersey, New Brunswick, NJ, United States, ⁴Center for Agrobiotechnology, Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russia, ⁵Department of General Hygiene, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Pulque is a traditional Mexican non-distilled alcoholic beverage to which several beneficial functions are attributed, mainly associated with gastrointestinal health, which can be explained by the presence of probiotic bacteria in its microbiota. Therefore, the objective of this work was to evaluate the safety, probiotic activity, and functional characteristics of seven strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from pulque using the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* NCFM as control. The LAB isolates were identified by 16S rRNA sequencing and MALDI Biotyper® MS as belonging to three different *Lactobacillaceae* genera and species: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis* and *Lacticaseibacillus paracasei*. Most strains showed resistance to gastric juice, intestinal juice and lysozyme (10 mg/L). In addition, all strains exhibited bile salt hydrolase (BSH) activity and antibacterial activity against the pathogenic strain *Listeria monocytogenes*. Additionally, cell surface characteristics of LAB were evaluated, with most strains showing good hydrophobicity, auto-aggregation, and co-aggregation towards enteropathogenic *Escherichia coli* and *L. monocytogenes*. In terms of safety, most of the strains were sensitive to the tested antibiotics and only the *Lact. paracasei* UTMB4 strain amplified a gene related to antibiotic resistance (*mecA*). The strains *Lact. plantarum* RVG2 and *Lact. plantarum* UTMB1 presented γ -hemolytic activity, and the presence of the virulence-related gene *agg* was identified only in UTMB1 strain. Regarding functional characterization, the tested bacteria showed good β -galactosidase activity, antioxidant activity and cholesterol reduction. Based on principal component analysis (PCA) and heat mapping, and considering the strain *Lact. acidophilus* NCFM as the probiotic reference, the strains *Lacticaseibacillus paracasei* UTMB4, *Lactiplantibacillus plantarum* RVG4 and *Levilactobacillus brevis* UTMB2 were selected as the most promising probiotic strains. The results of this study highlighted the probiotic, functional and safety traits of LAB strains isolated from pulque thus supporting the health benefits attributed to this ancestral beverage.

Caracterización del potencial probiótico y funcional de bacterias ácido lácticas aisladas del pulque

Ruiz-Ramírez Yesica¹, Valadez-Blanco Rogelio², Pérez-Chabela M. Lourdes¹, Calderón-García Concepción², Guadarrama-Mendoza Paula Cecilia², Ponce-Alquicira Edith*¹

¹Departamento de Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, 09340, Iztapalapa, Ciudad de México, México

²Instituto de Agroindustrias, Universidad Tecnológica de la Mixteca, Carretera a Acatlima km 2.5, 69000 Huajuapán de León, Oaxaca, México

*Corresponding author: pae@xanum.uam.mx

Abstract. Pulque is an ancestral Mexican beverage that, according to literature reports, provides several health benefits. The objective of this work was to evaluate in vitro probiotic activity and functional characteristics of eight strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from pulque. The LAB isolated were identified as *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis* and *Lactocaseibacillus paracasei*. The strains showed good results in tests for resistance to gastrointestinal conditions, safety and cell surface characteristics. All strains exhibited BSH activity and antibacterial activity. Additionally, the tested bacteria showed β -Galactosidase activity, antioxidant activity and cholesterol assimilation. The tested strains compared favorably with the control *Lact. acidophilus* NCFM. Based on a multivariate analysis using PCA and heat mapping the strains *Levilactobacillus brevis* UTMB2 and *Lactiplantibacillus plantarum* RVG4 were selected as the most promising probiotic strains. The results of this study supporting the health benefits attributed to this ancestral beverage.

Keywords. antioxidant activity, β -galactosidase activity, adherence, cholesterol assimilation, *Lactobacillaceae*

Resumen. El pulque es una bebida ancestral mexicana que, de acuerdo con reportes en la literatura, proporciona diversos beneficios a la salud. El objetivo de este trabajo fue evaluar in vitro la actividad probiótica y funcional de ocho bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas del pulque. Las BAL fueron identificadas como *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis* and *Lactocaseibacillus paracasei*. Las cepas mostraron buenos resultados en las pruebas de resistencia a condiciones gastrointestinales, seguridad y características de la superficie celular. Todas las cepas exhibieron actividad BSH y actividad antibacteriana. Adicionalmente, las cepas presentaron actividad β -galactosidasa, actividad antioxidante y asimilación de colesterol. Las cepas probadas se compararon favorablemente con el control *Lact. acidophilus* NCFM. Basado en un análisis multivariado usando PCA y mapa de calor, las cepas *Levilactobacillus brevis* UTMB2 y *Lactiplantibacillus plantarum* RVG4 fueron seleccionadas como las cepas probióticas más prometedoras. Los resultados de este estudio respaldan los beneficios para la salud atribuidos a esta bebida ancestral.

Palabras clave. actividad antioxidante, actividad β -galactosidasa, adherencia, asimilación de colesterol, *Lactobacillaceae*



**COLEGIO MEXICANO
DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.**
Biochemical Engineering Mexican Association

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

It is certified, that:

Yesica Ruíz Ramírez, Rogelio Valadez Blanco, María de Lourdes Pérez Chabela, Concepción Calderón García, Paula Cecilia Guadarrama Mendoza, Edith Ponce Alquicira

Authors of the work:

“Caracterización del potencial probiótico y funcional de bacterias ácido lácticas aisladas del pulque”


Keyword: : FTC212RUI20220315

**Selected to present orally for its high quality In the
Food technology area**

of the XII International Congress, XXIII National Congress on Biochemical Engineering, and the XIX Biomedicine and Molecular Biotechnology Scientific Meetings, held at Bahías de Huatulco, Oaxaca, México, from April 6th to 8th, 2022.


 Raúl Chávez Alvirco, M. en Rl.
 President




 Deifilia Ahuatzí Chacón, PhD.
 Chair Scientific Committee



5.



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS: PRODUCTOS NATURALES Y ALIMENTOS



Otorgan la presente

CONSTANCIA

A la M.C. Yesica Ruíz Ramírez

Por su participación en el seminario de investigación intitulado:

“Caracterización del potencial probiótico y funcional de bacterias ácido lácticas aisladas del pulque”

Impartido a investigadores y alumnos de la Maestría en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos

18 de marzo de 2022
Huajuapán de León, Oaxaca, México

Dr. José Aníbal Arias Aguilar
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

Labor et Sapientia, Libertas



**DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO**

Dra. Thalía I. Ramírez Reyes
Coordinadora de la Maestría en Ciencias:
Productos Naturales y Alimentos



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00283

Matrícula: 2192802076

Evaluación probiótica y funcional de bacterias de la familia Lactobacillaceae aisladas del pulque.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 18 del mes de enero del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA
DR. ISRAEL GARCIA CANO
DR. ALEJANDRO ALBERTO AZAOLA ESPINOSA
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA
DE: YESICA RUIZ RAMIREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



YESICA RUIZ RAMIREZ
ALUMNA

REVISÓ
[Signature]
MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

[Signature]
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

[Signature]
DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA

VOCAL

[Signature]
DR. ISRAEL GARCIA CANO

VOCAL

[Signature]
DR. ALEJANDRO ALBERTO AZAOLA
ESPINOSA

SECRETARIO

[Signature]
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO